Analyse von Herkunft und funktioneller Aktivität humaner membranständiger Glucocorticoidrezeptoren

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin
Cindy Strehl
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzender: Prof. Dr. Peter Neubauer
Berichter: Prof. Dr. Roland Lauster
Berichter: Prof. Dr. Frank Buttgereit

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24. Oktober 2011

Berlin 2011

D83

Meiner Familie...

„Wer A sagt, der muss nicht B sagen.
Er kann auch erkennen, dass A falsch war.“

(Berthold Brecht 1898 – 1956)
Der Jasager. Der Neinsager 1929 - 1930

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 17

Abstract 19

1. Einleitung 23

1.1 Hormone – die Botenstoffe des Körpers 23

1.1.1 Allgemeines 23

1.1.2 Die Steroidhormone: Ein Grundgerüst - Unterschiedliche Wirkungen 24

1.1.2.1 Biosynthese und Regulation der Steroidhormone 25

1.1.2.2 Einteilung der Steroidhormone und deren allgemeine Wirkung 26

1.2 Glucocorticoide 28

1.2.1 Klinisch relevante Effekte von Glucocorticoiden 28

1.2.2 Das Wundermittel und seine Schattenseiten 31

1.2.3 Wirkmechanismen der Glucocorticoide 32

1.2.3.1 Genomische GC Effekte werden durch einen cytosolischen Rezeptor vermittelt 32

1.2.3.2 Transaktivierung und Transrepression von Genen 34

1.2.3.3 Schnelle Effekte von GC werden durch nicht-genomische Effekte vermittelt 36

1.2.3.4 cGCR vermittelte nicht-genomische Wirkmechanismen von GC 37

1.2.3.5 Unspezifische Effekte entstehen durch Wechselwirkungen mit zellulären Membranen 37

1.2.3.6 Spezifische nicht-genomische GC Effekte werden durch den membranständigen GCR ausgelöst 38

1.2.4 Der membranständige Glucocorticoidrezeptor 38

1.2.4.1 Nachweismethode mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung 38

1.2.4.2 Vorkommen und klinische Relevanz des mGCRs 39

1.3 Vertreter der nukleären Hormonrezeptoren mit membranständigen Isoformen 41

1.3.1 Der humane Östrogen- und Progesteronrezeptor 41

1.3.1.1 Proteinstruktur, Isoformen und Signalübertragung 41

1.3.1.2 Durch Östradiol vermittelte nicht-genomische Effekte 43

1.3.1.3 Nicht-genomische Progesteron Wirkung 44

1.4 Ableitung der Fragestellung 49

2. Material und Methoden 53

2.1 Material 53

2.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme 53

2.1.2 Medien 54

2.1.3 Antikörper, Antikörperkonjugate und Beads 54

2.1.4 Plasmide, siRNA und Vektoren 55

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide 56

2.1.6 Chemikalien, Antibiotika, Molekulargewichtstandards und Enzyme 57

2.1.7 Lösungen, Puffer und Kits 59

2.1.8 Geräte und sonstige Materialien 60

2.1.9 Software 62

2.2 Methoden 63

2.2.1 Mikrobiologische Methoden 63

2.2.1.1 Transformation 63

2.2.1.2 Bakterienkultur 63

2.2.2 Zellbiologische Methoden 63

2.2.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen 63

2.2.2.2 Kultivierung von adhärenten Zellen 64

2.2.2.3 Kultivierung von Suspensionszellen 64

2.2.2.4 Isolation mononukleärer Zellen aus humanem peripherem Blut (PBMCs) 64

2.2.2.5 Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) primärer CD14+ oder CD4+ Zellen 65

2.2.2.6 Zellzahlbestimmung 66

2.2.2.6.1 Neubauer-Zählkammer 66

2.2.2.6.2 Casy Zellzählsystem 66

2.2.2.7 Transfektions- und Transduktionsmethoden 66

2.2.2.7.1 Transiente Transfektion zur Suppression der Genexpression mittels RNA-Interferenz (RNAi) 66

2.2.2.7.2 Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK 293T Zellen für Reportergenassay zum Nachweis der Reinheit und Stabilität von Dex-BSA via Luciferase- Reportergenassay 66

2.2.2.7.3 Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK 293T Zellen zur Herstellung von Virenpartikeln 67

2.2.2.7.4 Transduktion von HEK 293T Zellen 67

2.2.2.8 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung 68

2.2.2.9 Hochsensitive Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis mGCR positiver Zellen 68

2.2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden 69

2.2.3.1 RNA- und DNA-Analysen 69
2.2.3.1.1 Isolation von Plasmid-DNA 69
2.2.3.1.2 Isolation von Total-RNA 69
2.2.3.1.3 Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration 70
2.2.3.1.4 Klonierung der verschiedenen pLL3.7 GCR sh Vektoren 70
2.2.3.1.5 cDNA-Synthese 73
2.2.3.1.6 Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR 73
2.2.3.1.7 Genexpressionsanalyse mittels Microarray 75
2.2.3.2 Proteinanalysen 76
2.2.3.2.1 Proteinisolation nach Zelllyse – Gesamtzellextrakt 76
2.2.3.2.2 Proteinisolation für eine Immunpräzipitation 76
2.2.3.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA Verfahren 77
2.2.3.2.4 TNF-alpha ELISA 77
2.2.3.2.5 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 78
2.2.3.2.6 Analyse aufgetrennter Proteine mittels Western Blot 79
2.2.3.2.7 Nachweis der durch Western Blot übertragenen Proteine mittels Chemilumineszenz 79
2.2.3.2.8 Isolation und Aufreinigung membrangebundener Proteine mittels Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Kit und Slide-A-Lyzer® Dialyse Cassette 80
2.2.3.2.9 Immunpräzipitation zur Anreicherung von Proteinen 80
2.2.3.2.10 Luciferase-Reportergenassay 82
2.2.3.2.11 Analyse kinomischer Effekte mittels PepChip™ Kinase Array 82
2.2.3.2.12 Analyse kinomischer Effekte mittels Bio-Plex® Phosphoprotein Assay 83

3. Ergebnisse 89

3.1 Vorkommen des mGCR und dessen Expressionsfrequenz unter Einfluss verschiedener Stimuli 89
3.2 Anwendung der RNAi- Technologie zur Klärung der Herkunft der mGCR 92
3.2.1 siRNA vermittelte Effekte auf den humanen GCR 93
3.2.1.1 Zielsequenzen der entwickelten siRNA 93
3.2.1.2 Effekte auf die GCR mRNA Expression 94
3.2.1.3 Analyse der Reduktion der cGCR Proteinmenge mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse 95
3.2.1.4 Analyse der Reduktion der mGCR Expression mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzanalyse 96

3.2.2 shRNA vermittelte Effekte auf den humanen GCR 99

3.2.2.1 Etablierung von stabilen HEK 293T GCR-Knockdown Zelllinien 99

3.2.2.2 Effekte auf die GCR mRNA Expression 102

3.2.2.3 Reportergenassay zur funktionellen Kontrolle des GCR-Knockdowns 102

3.2.2.4 Analyse der Reduktion der cGCR Proteinmenge mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse 103

3.2.2.5 Analyse der Reduktion der mGCR Expression mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzanalyse 104

3.2.2.6 Analyse der Effekte eines durch mehrere shRNAs vermittelten Knockdowns 106

3.3 Anwendung einer Immunpräzipitation zur Isolation des mGCRs aus humanen Monozyten 110

3.3.1 Etablierung der Methode der Immunpräzipitation mittels cytosolischen Glucocorticoidrezeptors 110

3.3.2 Immunpräzipitation des mGCR 112

3.3.2.1 mGCR-IP aus intakten humanen Monozyten 112

3.3.2.2 mGCR-IP aus einer Membranfraktion von humanen Monozyten 113

3.4 Analyse der funktionellen Aktivität des humanen mGCRs 116

3.4.1 Luciferase-Reportergenassay zur Kontrolle der Reinheit von Dex-BSA 116

3.4.2 Analyse schneller über Kinasen vermittelter Effekte 119

3.4.2.1 Anwendung des PepChip™ Kinase Verfahrens zur Identifizierung von Phosphorylierungsprozessen 119

3.4.2.2 Validierung der im PepChip™ identifizierten p38 MAP-Kinase mittels Phosphoprotein Bio-Plex® und Western Blot Analyse 123

3.4.3 Analyse der Effekte von Dex-BSA auf das Genexpressionsprofil 125

3.4.3.1 Vorauswahl geeigneter Spender mittels TNFα ELISA 125

3.4.3.2 Analyse der Genexpression mittels Microarray 126

4. Diskussion 133

4.1 Ein Gen kodiert sowohl den cGCR als auch den mGCR 135

4.2 Der mGCR ist funktionell aktiv und vermittelt Signale nach Aktivierung über (De)Phosphorylierungsprozesse was wiederum eine differentielle Genexpression zur Folge hat. 142

4.3 Schlussfolgerung 146

4.4 Ausblick 148

5. Referenzen 153

6. Danksagung 165

7. Eidesstattliche Erklärung 167

8. Lebenslauf/Curriculum Vitae 169

9. Eigene Publikationen im Rahmen dieser Arbeit 173

10. Anhang 179

10.1 Abkürzungsverzeichnis 179

10.2 Abbildungsverzeichnis 182

10.3 Tabellenverzeichnis 185

10.4 Ergänzende Daten 187

Zusammenfassung/Abstract

Zusammenfassung

Hintergrund/Ziele: Glucocorticoide (GC) gehören zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten für die Behandlung einer Vielzahl von rheumatischen oder anderen entzündlichen Erkrankungen. Ihre anti-entzündliche und immunsupprimierende Wirkung wird vornehmlich durch die sogenannten *genomischen* Mechanismen, also über den cytosolischen Glucocorticoidrezeptor (cGCR) vermittelt. Aber es existieren auch schnelle GC-Effekte, die durch spezifische und unspezifische *nicht-genomische* Mechanismen vermittelt werden. Es wird angenommen, dass der membranständige Glucocorticoidrezeptor (mGCR) bei den spezifischen, nicht-genomischen GC-Effekten eine wichtige Rolle spielt. Hierzu wurde beispielsweise gezeigt, dass der mGCR auf Monozyten von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis, hochreguliert wird und die Expressionsfrequenz mit der Krankheitsaktivität positiv korreliert. Veränderte Expressionen des mGCRs wurden im Vergleich zu Gesunden auch für andere entzündliche Erkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematodes, der ankylosierenden Spondylitis oder nach Impfungen gezeigt. Daher wurde eine klinische Relevanz des mGCRs vermutet, jedoch sind sowohl dessen Herkunft als auch seine funktionelle Aktivität ungeklärt und deshalb Ziel dieser Studie.

Methoden/Feststellungen: Die Herkunft des mGCRs wurde mittels der RNA-Interferenz Technologie untersucht. Dafür wurden mGCR positive HEK293T Zellen mit GCR-siRNA transfiziert. Die Effektivität der RNAi-vermittelten GCR Reduktion wurde auf mRNA Ebene mittels RT-qPCR überprüft und die Reduktion der cGCR Proteinmenge über Immunoblot-Analyse nachgewiesen. Die Analyse der mGCR Expression mittels hochsensitiver Immunfluoreszenz zeigte jedoch, dass eine transiente Reduktion der GCR mRNA nicht zu einer Verminderung der mGCR Expression führt. Im Gegensatz dazu führte eine stabile Herabregulation der GCR mRNA mittels shRNA Technologie zu einer signifikant verminderten mGCR Expression.
Für die Analyse der funktionellen Aktivität der mGCR wurden humane CD14+ Monozyten für 24h mit LPS stimuliert, um die mGCR Expression auf bis zu 70% zu erhöhen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit der membranimpermeablen Substanz Dexamethason-BSA (Dex-BSA), mit Dexamethason oder BSA allein behandelt. Um schnelle Effekte mittels Kinom-Analyse zu identifizieren, wurde eine kurze Inkubationszeit von 20min gewählt. Für die Genom-Analyse wurde eine zusätzliche Inkubation von 3h angeschlossen. Die Kinom-Analyse wurde mit Hilfe der PepChip™ Technik durchgeführt und zeigte, dass durch Dex-BSA schnelle (De)Phosphorylierungsprozesse über Kinasen induziert werden. Es wurden einige MAP-Kinasen, wie z.B. die p38 MAPK identifiziert, welche durch Dex-BSA verstärkt phosphoryliert wurden.
Die Genom-Analyse mittel *Microarray* offenbarte auch Effekte des Dex-BSA auf die Genexpression. Eine Klassifizierung der identifizierten Gene in biologische Prozesse mit Hilfe der Panther Datenbank ergab, dass vor allem Prozesse der Signaltransduktion und des Metabolismus beeinflusst werden.

Schlussfolgerungen/Relevanz: Diese Studie zur Analyse der Herkunft und der funktionellen Aktivität des mGCRs bewies erstmals, dass nur ein Gen existiert welches sowohl den cGCR als auch den mGCR codiert. Eine kurzzeitige Herabregulation der GCR mRNA beeinflusste die mGCR Expression nicht. Erst ein stabiler Knockdown zeigte einen Effekt auf die mGCR Expression. Daher kann zusätzlich geschlussfolgert werden, dass das mGCR Protein selbst eine lange Halbwertszeit bzw. eine hohe Stabilität aufweist.

Durch Aktivierung des mGCRs mittels membranimpermeablen Dex-BSA konnte ebenfalls zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch den mGCR Signale von außerhalb über schnelle (De)Phosphorylierungsprozesse mittels Kinasen in das Zellinnere weitergeleitet werden. Weiterhin konnte deutlich gemacht werden, dass die Aktivierung des mGCR auch einen Einfluss auf die Genexpression hat. Dadurch ist bewiesen, dass der mGCR tatsächlich funktionell aktiv ist. Der mGCR stellt daher ein interessantes Ziel für optimierte Behandlungsstrategien rheumatischer oder anderer entzündlicher Erkrankungen dar.

Abstract

Background/Aims: Glucocorticoids (GC) are the most common used drugs in the treatment of a wide range of rheumatic and other inflammatory diseases. They exert their anti-inflammatory and immunosuppressive effects primarily via so called *genomic* mechanisms, thus mediated by the cytosolic glucocorticoid receptor (cGCR). However, rapid effects of GC exist, which are mediated by specific and unspecific *non-genomic* mechanisms. The membrane-bound glucocorticoid receptor (mGCR) has been suggested to play an important role by the mediation of specific non-genomic GC-action. It has already been shown, that mGCRs are up-regulated on monocytes of patients with inflammatory diseases, like rheumatoid arthritis, and that the frequency of mGCR expression positively correlates with the disease activity. Furthermore, modified mGCR expression has been shown for other inflammatory diseases like systemic lupus erythematosus, ankylosing spondylitis or after vaccination. Indeed, the clinical relevance of mGCR has been assumed, but the origin and functional activity remained unexplained and are in focus of this study.

Methods/Results: The origin of the mGCR was investigated via RNA-interfence Technology. Therefore, mGCR positive HEK293T cells were transfected with GCR-siRNA. The efficacy was verified on mRNA level by RT-qPCR and the reduction of cGCR protein was investigated by immunoblot analysis. A transient reduction of the GCR mRNA does not decrease mGCR protein expression, as shown by high-sensitive immunofluorescent staining. In contrast, however, stable knockdown of GCR mRNA via shRNA technology showed a significantly diminished mGCR expression.
For the analysis of the functional activity of mGCR, human CD14+ monocytes were stimulated with LPS for 24 hours in order to increase mGCR expression up to 70%. Subsequently, cells were treated with membrane-impermeable dexamethasone bound to BSA (Dex-BSA), Dexamethason or BSA alone. In order to identify rapid effect via kinome analysis, a short incubation time about 20 minutes was chosen. For a genome analysis, cells were incubated for additional 3 hours. Using the PepChip™ array technique, a Dex-BSA specific induction of rapid (de)phosphorylation processes mediated by different kinases has been shown. A number of MAP-kinases, including p38 MAPK, were identified to show an increased phosphorylation according to Dex-BSA treatment.
A genome analysis via microarray also revealed that Dex-BSA altered gene expression. A functional classification into biological processes of identified genes via Panther database demonstrated that processes of signal transduction and metabolism are most affected.

Conclusion: This study concerning the analysis of origin and functional activity of mGCR revealed for the first time, that there is only one gene encoding for both, the cGCR as well as for the mGCR. A transient knockdown of GCR mRNA showed no effect on mGCR expression, whereas a stabile knockdown affected mGCR expression. These results demonstrate that the mGCR protein owns a high stability due to its long half-life.
Furthermore, an activation of mGCR by membrane-impermeable Dex-BSA revealed that external signals were transferred in the cell via rapid (de)phosphorylation processes by the mean of kinases. Additionally, it has been shown for the first time that an activation of the mGCR results in an altered gene expression. This is the evidence of the functional activity of the mGCR. mGCRs represent an interesting target for optimised treatment strategies in case of rheumatic or other inflammatory diseases.

Einleitung

1. Einleitung

1.1 Hormone – die Botenstoffe des Körpers

1.1.1 Allgemeines

Die Kommunikation zwischen Zellen und Organen im Körper, auch über große Distanzen, unterliegt einem sehr komplexen System der Signalübertragung. Eine Möglichkeit, neben der Weiterleitung von Signalen über das Nervensystem, sind die sogenannten Hormone. Hinter der Bezeichnung Hormon (altgr. *hormáō* für antreiben) verbirgt sich eine Ansammlung verschiedener biochemischer Botenstoffe, die von spezialisierten Zellen produziert und abgegeben werden, um spezifische Wirkungen oder Regulationsfunktionen an den Zellen der Zielorgane zu verrichten. Im Jahr 1905 prägte Ernest Starling den klassischen Begriff Hormon, welcher bis heute noch Anwendung findet, durch seine Aussage: *'These chemical messengers, however, or hormones (from όρμαω, I excite or arouse) as we might call them, have to be carried from the organ where they are produced to the organ which they affect by means of the blood stream and the continually recurring physiological needs of the organism must determine their repeated production and circulation throughout the body.'*[1]. Er entdeckte, dass durch Stimulation mit Salzsäure aus der Darmwand ein Stoff freigesetzt wurde, der die Bauchspeicheldrüsen-Sekretion anregte.
Heute ist bekannt, dass Hormone an einer Vielzahl von Prozessen im Körper, wie z.B. Wachstum, Entwicklung, Koordination von Stoffwechselvorgängen oder auch der Funktion vieler Organe, beteiligt sind. Hormone können dabei auf unterschiedliche Weise wirken: Als autokriner Effekt wird die Wirkung von Hormonen auf die Hormon produzierende Zelle selbst bezeichnet. Ist das Signal für das benachbarte Gewebe bestimmt, spricht man von einer parakrinen Wirkung. Wird das Hormon über weite Strecken über die Blutbahn zum Effektororgan transportiert, handelt es sich um eine endokrine Wirkung [2-3] (Abb. I.1).

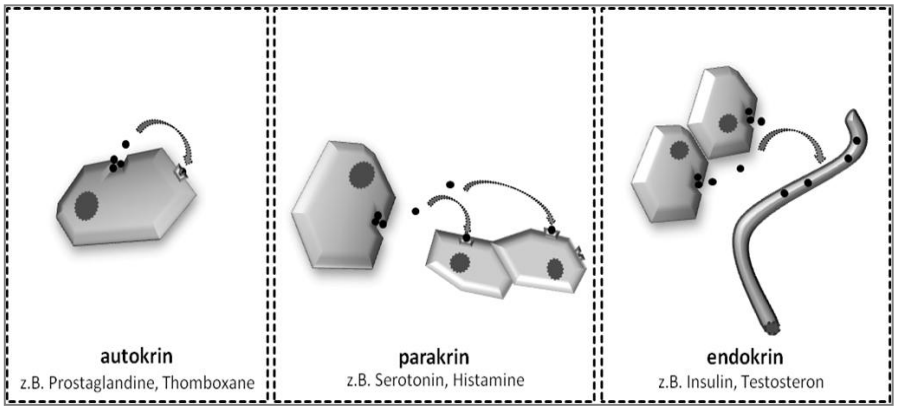

Abbildung I.1: Wirkung von Hormonen. Der autokrine Effekt definiert die Wirkung auf die Hormon-produzierende Zelle selbst. Die parakrine Hormonwirkung bezeichnet Signale, die für das Nachbargewebe bestimmt sind und ein Transport mittels Blut über weite Strecken wird als endokrine Hormonwirkung bezeichnet.

Die Hormonsynthese und –ausschüttung unterliegt einer strengen Regulation, wobei die meisten Hormone durch die Rückkopplung *(positiver oder negativer Feedbackmechanismus)* gesteuert werden. So wird beispielsweise das Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) vom Hypothalamus freigesetzt, welches in der Hypophyse die Freisetzung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) auslöst. Dies führt zur Bildung und Freisetzung von Cortisol. Gelangt das Cortisol über das Blut in das Gehirn wird die Bildung und Freisetzung von CRH und ACTH unterdrückt [2]. Eine andere Möglichkeit der Regulation von Hormonen sind nichthormonelle chemische Botenstoffe wie zum Beispiel die Calciumkonzentration oder die Glukosekonzentration im Blut.
Eine Klassifizierung von Hormonen kann aufgrund ihrer *chemischen* Zuordnung (z.B. Peptidhormone, Aminosäurederivate, oder Steroidhormone) oder anhand ihrer *Herkunft* (z.B. Drüsenhormone, Neurohormone und Gewebshormone) erfolgen. Aufgrund ihrer *biochemischen* Eigenschaften unterscheidet man zwei Arten von Hormonen: lipidunlösliche und lipidlösliche Hormone. Lipidunlösliche, hydrophile Hormone können die Zellmembran nicht passieren und binden stattdessen an spezifische membrangebundene Rezeptoren der Zielzellen. Es entsteht der sogenannte *Hormon-Rezeptor-Komplex* welcher in der Lage ist, eine intrazelluläre chemische Substanz, den sekundären Botenstoff (*Second Messenger*) zu aktivieren. Einer der am häufigsten vorkommenden sekundären Botenstoffe ist das cyclische AMP (cAMP). Die Wirkung von cAMP beruht hauptsächlich auf der Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), welche Phosphatgruppen auf Proteine überträgt. Die phosphorylierten Proteine wirken entweder als aktivierte Enzyme oder als aktivierte Transkriptionsfaktoren bzw. Genregulatorproteine, wodurch die Weiterleitung eines extrazellulären Signals gewährleistet wird.
Im Gegensatz dazu können lipidlösliche Hormone aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften leicht durch die Zellmembran in die Zelle eindringen, im Cytoplasma an spezifische Rezeptoren binden und dort ebenfalls einen *Hormon-Rezeptor-Komplex* bilden. Durch Dissoziation verschiedener Moleküle von dem Komplex nach Bindung des Hormons und Bildung von Rezeptordimeren, ist dieser nun in der Lage durch die Kernmembran zur DNA zu gelangen und an diese zu binden. Dort entfalten die *Hormon-Rezeptor-Komplexe* ihre Wirkung, indem sie die Transkription der DNA beeinflussen.

1.1.2 Die Steroidhormone: Ein Grundgerüst - Unterschiedliche Wirkungen

Zu der Gruppe der lipidlöslichen Hormone zählen beispielsweise die Steroidhormone (griech. *stereos* für fest), welche sich in die Corticoide der Nebennierenrinden und die Sexualhormone der Hoden bzw. der Eierstöcke einteilen lassen. Steroidhormone haben eine starre Molekülgestalt, in der Regel einen relativ hohen Schmelzpunkt und lassen sich gut kristallisieren. Sie werden mit dem Blut in das Zielgewebe transportiert, wo sie an hochspezifische Rezeptoren bestimmter Zellen binden und dadurch Veränderungen in der Genexpression und somit im Stoffwechsel auslösen. Die Steroidhormone bilden jeweils eine

Familie, deren Mitglieder eine steroidähnliche Struktur und bestimmte biologische Wirkungen besitzen.

1.1.2.1 Biosynthese und Regulation der Steroidhormone

Die Biosynthese der Steroidhormone geht vom Cholesterin (oder einem direkten chemischen Verwandten) aus, welches von den Hormon bildenden Zellen mittels Acetyl-CoA selbst synthetisiert oder aus dem Blut aufgenommen wird. Eine wichtige Enzymgruppe für die Steroidhormon-Biosynthese sind die sogenannten Cytochrom P450 Enzyme. Der Wirkgruppentyp Cytochrome P450 wurde 1955 von Williams [4], und drei Jahre später von Klingenberg [5] unabhängig voneinander in NADPH-reduzierten Lebermikrosomen aus Ratten nach Begasung mit CO nachgewiesen. Omura und Sato lieferten den Beleg einer Hämproteinstruktur und schlugen den Namen „Cytochrom P450“ vor [6], da sie dachten ein „echtes“ Cytochrom gefunden zu haben und das Protein nach Begasung mit CO ein Absorptionsmaximum bei 450nm zeigte.
Im ersten Syntheseschritt wird die Seitenkette des Cholesterin-Moleküls abgespalten, wodurch das Steroid-Derivat Pregnenolon entsteht. Pregnenolon ist eine Vorstufe für sämtliche anderen Steroidhormone und besteht aus 21-Kohlenstoff-Molekülen (C_{21}-Steroid). Ausgehend von dieser Verbindung entsteht durch Dehydrogenierung und mehrere Hydroxylierungen aus Pregnenolon das Cortisol. Andererseits entstehen nach Abspaltung einer C_2 Gruppe vom Pregnenolon die C_{19}-Steroide, die Androgene, welche wiederum die Vorstufe der Östrogene sind. Ein Überblick über die Steroidhormon-Biosynthese ist in Abb. I.2 dargestellt.

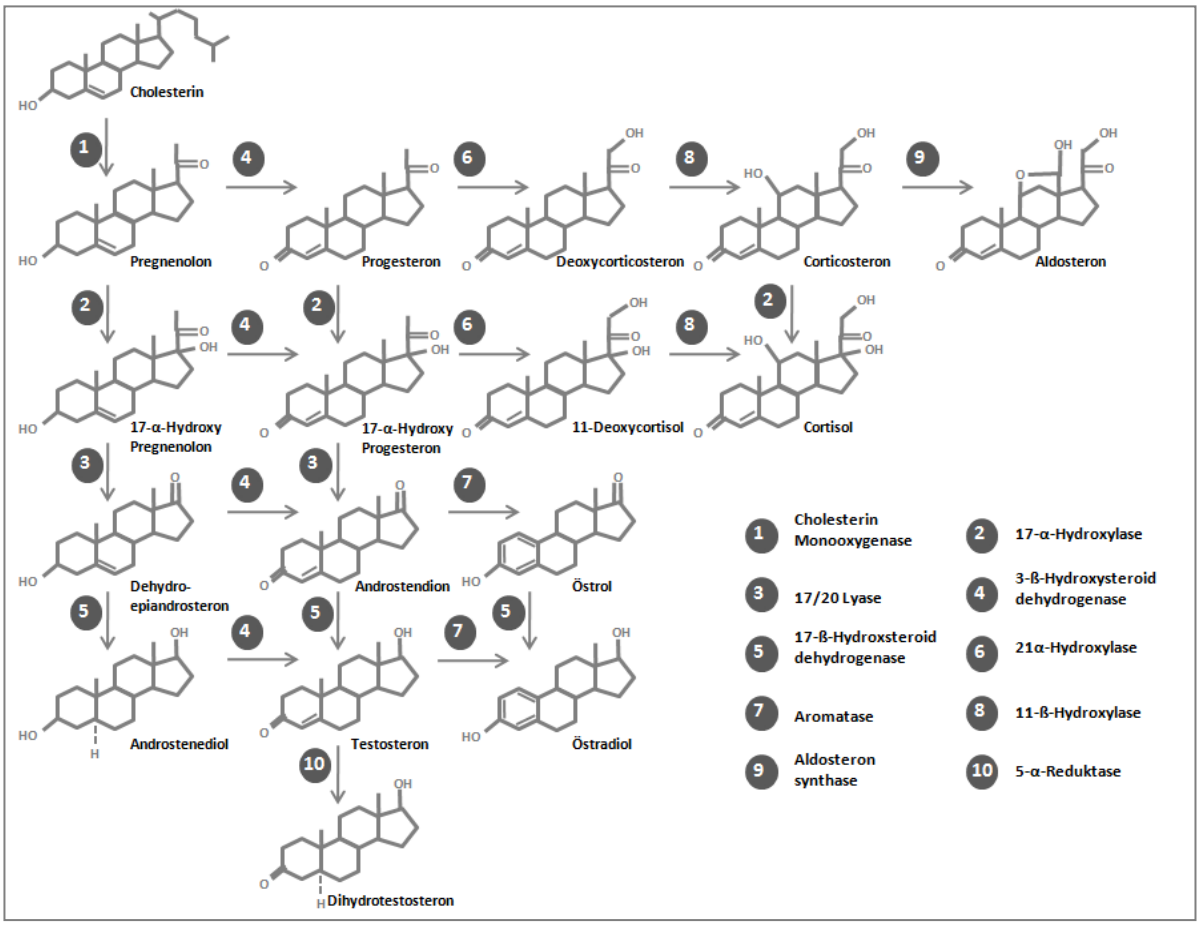

Abbildung I.2: Darstellung der Steroidhormon-Biosynthese. Ausgehend vom Cholesterin werden in mehreren Schritten alle Steroidhormone synthetisiert, wobei die verantwortlichen Enzyme häufig zum Typ der Cytochrom P450 Wirkgruppe gehören.

Durch eine kontrollierte Aufnahme von Cholesterin kann die Biosynthese der Steroidhormone reguliert werden. Ebenfalls streng kontrolliert (durch die Hypophysenhormone ACTH, FSH (follikelstimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon)) wird der erste, geschwindigkeitsbestimmende Syntheseschritt, die Abspaltung der Seitenkette des Cholesterin-Moleküls durch die Cholesterin Monooxygenase [2, 7].

1.1.2.2 Einteilung der Steroidhormone und deren allgemeine Wirkung

Die Steroidhormone lassen sich in 5 Klassen einteilen (Tab. I.1).

Tabelle I.1: Klassen der Steroidhormone

Steroidklasse	Vertreter	Herkunft
Androgene	Testosteron	Gonaden
Östrogene	Östradiol	
Gestagene	Progesteron	
Mineralocorticoide	Aldosteron	Nebennierenrinde
Glucocorticoide	Cortisol	

Die Geschlechtshormone der Gonaden haben eine Wirkung auf die Fortpflanzungszyklen und auf Wachstum und Entwicklung, im speziellen auf die Ausprägung der Geschlechtsmerkmale. So sind z.B. die Androgene auch für Muskel- und Knochenwachstum verantwortlich und stimulieren das Sexualverhalten, wobei ein erhöhter Testosteronspiegel aber auch zu Aggressivität führen kann. Östrogene haben im Gegensatz dazu einen Einfluss auf die Ausbildung der weiblichen Geschlechtsorgane, aber sie fördern auch die Blutgerinnung und das Knochenwachstum. Gestagene sind für die Entwicklung und das Wachstum des Embryos verantwortlich und finden in der Medizin Anwendung als Verhütungsmittel.
Die Mineralocorticoide der Nebennierenrinde, deren Hauptvertreter Aldosteron ist, wirken vor allem auf den Salz- und Wasserhaushalt. Die Glucocorticoide (GC) wirken hingegen in Stresssituationen und haben einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel und das Immunsystem. Ein Beispiel dafür ist das Cortisol, welches u.a. die Synthese von Plasmaproteinen oder die Sekretion von Salzsäure steigert. Andererseits hemmt es sowohl die Aufnahme von Glukose als auch die Zellteilung.

1.2 Glucocorticoide

In den Jahren 1936-1940 gelang es mehreren Forschern gleichzeitig, eine ganze Reihe von Substanzen aus der Nebennierenrinde zu isolieren. Darunter befand sich auch das 17-Hydroxy-11-dehydro-Corticosteron, welches später den Namen Cortison erhielt. Dabei handelt es sich um die inaktive Form des Cortisols, welches ein Jahr später von Kendall als auch von Wintersteiner beschrieben wurde. 1938 gelang erstmals die Synthese eines Nebennierenwirkstoffs ausgehend vom Cholesterin. Erst zehn Jahre später wurden die Glucocorticoide (GC) in die Medizin eingeführt. Die Behandlung einer Frau, welche an chronischer Polyarthritis litt, mit einer pharmazeutischen Zubereitung von Cortison führte bereits nach drei Tagen zu einer ausgeprägten Schmerzminderung [8-9]. Seit dieser Zeit wurden die Glucocorticoide mehr und mehr in der Medizin angewandt. Die Forscher Kendall, Reichstein und Hench, welche an den grundlegenden Arbeiten zu Glucocorticoiden beteiligt waren [10-11], wurden 1950 mit dem Nobelpreis geehrt.
Die von der Nebennierenrinde produzierten Hormone spielen eine wichtige Rolle bei Regulationsprozessen im Körper, wobei hier vor allem Energieversorgungs- und Stoffwechselprozesse, sowie Fettmetabolismus und Anpassung an Stresssituationen im Vordergrund stehen. In der humanen Nebennierenrinde werden täglich zwischen 5 und 30 mg des aktiven Cortisols produziert, wobei dies zu einer maximalen Hormonkonzentration im Blut gegen 9 Uhr morgens und zu einem minimalen Cortisolspiegel um 24 Uhr führt. Eine Inaktivierung des Cortisols zu Cortison findet, vermittelt durch das Enzym 11-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11-β-HSD) [12], in der Leber statt. Die Endprodukte werden über den Harn ausgeschieden.

1.2.1 Klinisch relevante Effekte von Glucocorticoiden

Seit nunmehr über 60 Jahren finden Glucocorticoide Anwendung in der Medizin und haben sich als äußert effektive und kostengünstige Medikamente erwiesen. Antientzündliche und immunsuppressive Effekte betreffen hauptsächlich die Leukozyten, wobei GC einen starken Einfluss auf deren Funktion und deren Verteilung haben. Letztendlich werden aber alle primären und sekundären Immunzellen des Körpers mehr oder weniger durch Glucocorticoidbehandlung beeinflusst [13] (Tab. I.2).

Tabelle I.2: Antientzündliche und immunsuppressive Effekte von Glucocorticoiden auf die unterschiedlichen Zelltypen

Monozyten/Makrophagen
↓ Zahl der zirkulierenden Zellen (↓ Myelopoese, ↓ Freisetzung)
↓ Expression von MHC Klasse II Molekülen und Fc Rezeptoren
↓ Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B- IL-2, IL-6, TNFα) und Prostaglandinen
T Zellen
↓ Zahl der zirkulierenden Zellen (Umverteilungseffekte)
↓ Produktion und Wirkung von IL-2
Granulozyten
↓ Zahl der eosinophilen und basophilen Granulozyten
↑ Zahl der zirkulierenden Neutrophilen
Endothelzellen
↓ Gefäßpermeabilität
↓ Expression von Adhesionsmolekülen
↓ Produktion von IL-1 und Prostaglandinen
Fibroblasten
↓ Proliferation
↓ Produktion von Fibronectin und Prostaglandinen

Der bedeutendste therapeutische Effekt von GC ist also die Hemmung von Entzündungen. Ein typisches Merkmal der Entzündung ist die gesteigerte Synthese von Entzündungsmediatoren, wie z.B. Zytokinen oder Prostaglandinen, welche die typischen Zeichen einer Entzündung hervorrufen: Schmerzen, Schwellungen, Rötungen und Fieber [14]. GC vermindern den Kerntransport und damit die Funktionalität von pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren (TF) wie Activator Protein 1 (AP 1), Nuclear Factor-κB (NF-κB) oder Interferon Regulatory Factor-3 (IRF3) [15-20], welche an der Regulation der Expression von pro-inflammatorischen Genen beteiligt sind [21-22]. Dieses Prinzip wird „Transrepression“ genannt [23], wobei das Ergebnis eine verminderte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen ist (siehe Abschnitt 1.2.3). Andererseits bewirken GC eine gesteigerte Synthese von antientzündlichen Proteinen, was im Allgemeinen als „Transaktivierung“ bekannt ist. Jedoch werden im Zuge der Transaktivierung ebenfalls Regulatorproteine, wie z.B. Enzyme der Gluconeogenese vermehrt synthetisiert, wodurch neben den antientzündlichen und immunsuppressiven Effekten auch ein Großteil der Nebenwirkungen von GC hervorgerufen werden [23-25] (siehe Abschnitte 1.2.2 und 1.2.3).

Die Wirkung von Glucocorticoiden kann auf unterschiedliche Weise gezielt gesteuert werden. Endogene Steroide (Cortisol) binden dabei nicht ausschließlich den Glucocorticoidrezeptor sondern aktivieren auch den Mineralocorticoid-Rezeptor [26]. Durch Veränderungen am GC Molekül selbst wird z.B. die glucocorticoide Wirkung verstärkt, wohingegen die mineralocorticoide Wirkung reduziert wird [27]. Durch Alkylgruppen verändert sich die Löslichkeit in Fett oder Wasser und durch Einführung von Estern am

Molekül kann die Plasmahalbwertszeit beeinflusst werden. Klinische Effekte synthetischer GC sind dabei stark abhängig von der Absorptionsrate, der Affinität der GC zu deren Rezeptor, der Stoffwechselrate und natürlich von der verabreichten Dosis und damit von der Konzentration der GC im Zielgewebe [27]. Dabei gilt natürlich der Grundsatz: So wenig wie möglich, so viel wie nötig [28]. Im Jahr 2002 wurde eine Empfehlung für eine einheitliche GC-Dosierung veröffentlicht [29], wobei die Dosis an GC als „mg/Tag Prednisolonäquivalent" angegeben wird, da die genomischen Wirkungen der unterschiedlichen gebräuchlichen Glucocorticoide über die Äquivalenzdosis vergleichbar sind.

- Als „Low-dose", also Niedrigdosis-GC Therapie bezeichnet man eine Behandlung mit weniger als 7.5mg Prednisolonäquivalent/Tag. Diese Therapie ist einhergehend mit einer Sättigung der Glucocorticoidrezeptoren von weniger als 40-50% und zeigt relativ geringe Nebenwirkungen [30]. Heutzutage gilt sie als Standardbehandlung bei vielen chronischen Erkrankungen [14, 31-33].

- Eine tägliche Prednisolonäquivalenzdosis von 7.5–30mg führt zu einer erhöhten, jedoch nicht vollständigen Rezeptorsättigung. Diese „Mitteldosen" werden zwar erfolgreich bei der initialen Behandlung von chronisch rheumatischen Erkrankungen eingesetzt, zeigen jedoch bei längerfristiger Anwendung ein gesteigertes Potenzial Nebenwirkungen hervorzurufen [14, 25].

- Eine „Hochdosis"-GC Therapie beschreibt eine Behandlung mit 30–100mg Prednisolonäquivalent/Tag, was zu einer fast vollständigen Rezeptorsättigung führt. Jedoch kann diese Dosierung nicht in der Langzeittherapie angewandt werden, da ernsthafte Nebenwirkungen auftreten können [14, 25].

- Durch eine „sehr hohe GC Dosis" (tägliche Prednisolonäquivalenzdosis von mehr als 100 mg) und durch die sogenannte „Stoßtherapie" (Prednisolonäquivalenzdosis von mehr als 250mg/Tag für 1-5 Tage) werden alle Glucocorticoidrezeptoren abgesättigt. Diese Dosen werden bei akuten oder lebensbedrohlichen Erkrankungen eingesetzt, wobei auch hier eine langfristige Anwendung aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen vermieden werden muss [14, 25, 29].

Neben dieser systemischen Glucocorticoidbehandlung können diese Medikamente auch lokal appliziert werden. So wird im Fall von Gelenkerkrankungen (Arthritis) z.B. die intraartikuläre Injektion angewandt [34]. Lungenerkrankungen wie z.B. Asthma werden mittels Inhalation behandelt und bei Hautkrankheiten wie Ekzemen werden cortisonhaltige Cremes oder Salben eingesetzt [27].

1.2.2 Das Wundermittel und seine Schattenseiten

Glucocorticoide fanden mehr und mehr Anwendung bei der Behandlung einer großen Anzahl entzündlicher Erkrankungen auf allen Gebieten der Medizin. Hintergründe waren zum einen die hohe Wirksamkeit und zum anderen die kostengünstige Herstellung der Präparate. Ebenso schnell wurden aber auch, neben den starken antientzündlichen und immunsuppressiven erwünschten Effekten, unerwünschte Nebenwirkungen bekannt [23-24] (Abbildung I.3), weshalb es ab 1950 zu einer zunehmenden Ablehnung dieser Medikamente kam.

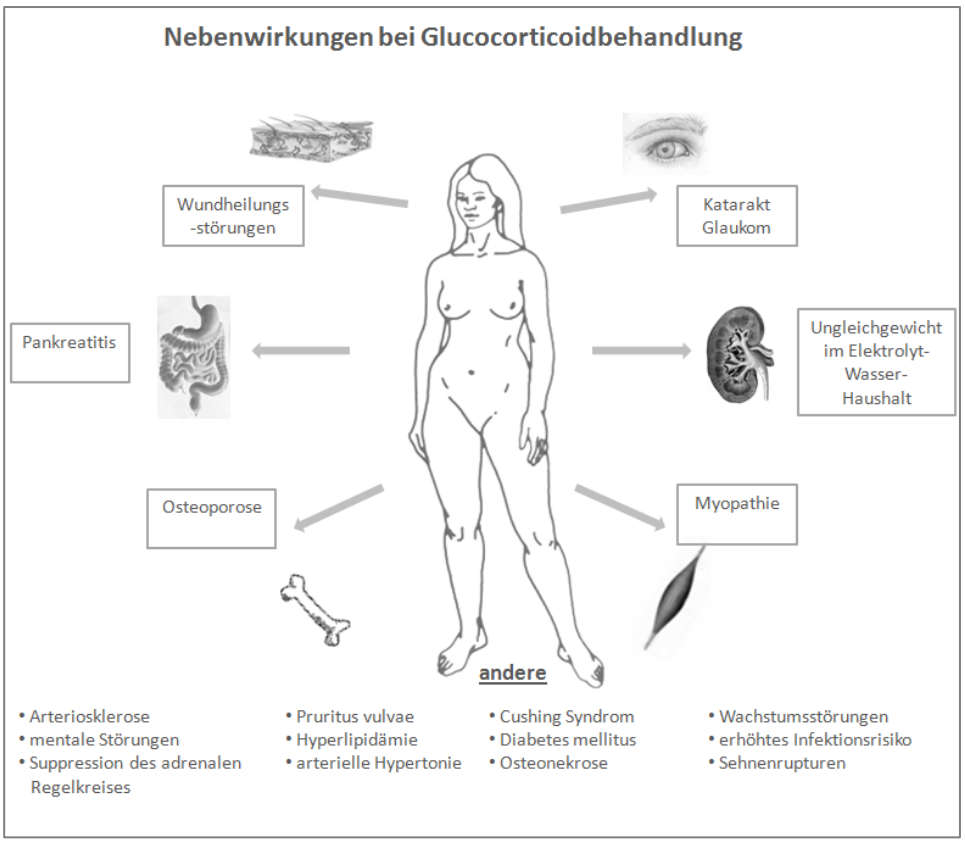

Abbildung I.3: Nebenwirkungen der Glucocorticoide. Kurz nach der Entdeckung der starken antientzündlichen Wirkungen von Glucocorticoiden wurde die große Zahl auftretender Nebenwirkungen der Medikamente bekannt. Osteoporose, Wachstumsstörungen bei Kindern/ Jugendlichen oder Diabetes mellitus sind nur einige von ihnen.

Vor allem treten unerwünschte Effekte von Glucocorticoiden nach hoher Dosierung oder nach einem längerem Behandlungszeitraum mit diesen Medikamenten auf. Häufig kommt es zu Veränderungen des Stoffwechsels, insbesondere des Kohlenhydrat-, des Fett- und des Proteinstoffwechsels. Dies kann zu Diabetes mellitus, einem erhöhten Gehalt und gestörter Verteilung des Körperfettes, oder zum Dünnwerden der Haut verbunden mit Wundheilungsstörungen führen [23-24]. Auch sind Schädigungen des Knochen weit verbreitet, wie z.B. die von Cushing beschriebene Knochendemineralisierung, die Osteoporose, welche inzwischen eine der bedeutendsten Nebenwirkung der chronischen GC Therapie geworden ist [30, 35-36]. Weiterhin wurden Muskel- und Sehnenveränderungen (z.B. Myopathie), Wechselwirkungen mit dem kardiovaskulären System (z.B. Arteriosklerose, arterielle Hypertonie), Veränderungen an den Augen (z.B. Katarakt, Glaukom) oder auch Schädigungen des Gastrointestinaltraktes (z.B. Magen/ Duodenalulcera) beschrieben [14].

Durch Behandlung mit Glucocorticoiden wird der Elektrolyt- und Wasserhaushalt im Körper gestört, wodurch eine Hypernatriämie, Hypokalzämie und arterielle Hypertonie auftreten können. Es besteht auch, wie bereits Hench 1949 in seiner ersten Publikation berichtete [8], ein erhöhtes Risiko einer Infektion. So lernte man rasch, dass bei einer viralen Infektion keine GC Therapie begonnen wird, sowie, dass Patienten während einer GC Behandlung regelmäßig auf Infektionen überprüft werden müssen. Andere Nebenwirkungen betreffen das zentrale Nervensystem und die Psyche. So berichteten Clark und Mitarbeiter über mentale Veränderungen (Stimmungsschwankungen, Euphorie, Depressionen und Psychosen) bei Patienten, welche eine Cortisontherapie erhielten [27, 37].

1.2.3 Wirkmechanismen der Glucocorticoide

Trotz intensiver Weiterentwicklungen und Verbesserungen in der Glucocorticoidtherapie [38] ist das Nutzen-Risiko-Verhältnis noch nicht optimal. Eine zusätzliche Verbesserung der Medikamente setzt voraus, dass der genaue Mechanismus der Glucocorticoidwirkung bekannt ist. Hier unterscheidet man die genomischen von den nicht-genomischen Glucocorticoideffekten [25].

1.2.3.1 Genomische GC Effekte werden durch einen cytosolischen Rezeptor vermittelt

Glucocorticoide gehören zu den lipidlöslichen Steroidhormonen, welche aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften leicht aus dem Blut durch die Zellmembran in die Zelle eindringen können. Dort bindet das Hormon an spezifische Rezeptoren und bildet den sogenannten *Hormon-Rezeptor-Komplex*. Es werden Rezeptordimere gebildet, welche nun in der Lage sind durch die Kernmembran zur DNA zu gelangen und an *glucocorticoid response elements* (GREs) zu binden. Dort entfalten sie ihre Wirkung indem sie die Transkription der DNA beeinflussen.
Der cytosolische Glucocorticoidrezeptor (cGCR) ist ein Mitglied der Steroidhormon-Rezeptor-Familie und liegt im Zellplasma als Multiproteinkomplex vor. An das 94kd Protein, welches zur Unterfamilie der nukleären Hormonrezeptoren zählt, sind einige Hitzeschockproteine (Hsp), wie z.B. Hsp90, Hsp70, Hsp56 oder Hsp40, angelagert [39-40]. Es existieren zusätzlich Wechselwirkungen mit Immunophilinen der FK506-bindenden Familie [41], (Co)Chaperonen (z.B. p23 oder Src) und einigen Kinasen des Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Signalsystems [42-43]. Molekulare (Co)Chaperone dienen vor allem im Zusammenspiel mit dem cGCR zur Stabilisierung einer bestimmten Konformation, welche den Ligand mit hoher Affinität bindet, während die Substratbindungsspalte für die GC geöffnet wird. Die Bindung des cGCR an den Promotor wird ebenfalls stabilisiert [33].
Im humanen Genom existiert nur ein Gen (*NR3C1;* nuclear receptor subfamily 3, group C member 1), welches etwa 2,5kb codierender Sequenz beinhaltet und den cGCR codiert [44-45]. Dieses besteht aus 9 Exons und befindet sich auf dem Chromosom 5q11-q13 [45]. Durch alternatives Spleißen von Exon 9 entstehen 2 unterschiedliche Rezeptorvarianten, die alpha-

(α) und die beta- (β) Isoform [44, 46]. Der αGCR wird durch Glucocorticoide aktiviert und entfaltet dadurch seine volle Funktion. Im Gegensatz dazu kann der βGCR, welcher nur einen geringen Anteil von 0,2 – 1% ausmacht, nicht an Glucocorticoide binden, weil dieser eine deformierte Ligand-Bindungsdomäne aufweist [46-48]. Beide Isoformen gleichen sich vom N-Terminus bis zur Aminosäure 727. Nach dieser Position verfügt die α-Isoform über 50 weitere Aminosäuren, hingegen die β-Isoform lediglich über 15 zusätzliche Aminosäuren, welche sich gänzlich von denen des αGCR unterscheiden [45]. Mit der Zeit wurden weitere Rezeptorvarianten entdeckt, welche, je nach Translationsstart, Unterschiede in der Länge des N-Terminus zeigen [46]. Durch posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierung oder Sumoylierung, werden weitere Rezeptorvarianten erzeugt, welche sich in ihrer transkriptionellen Aktivität unterscheiden [49-54] (Abb. I.4).

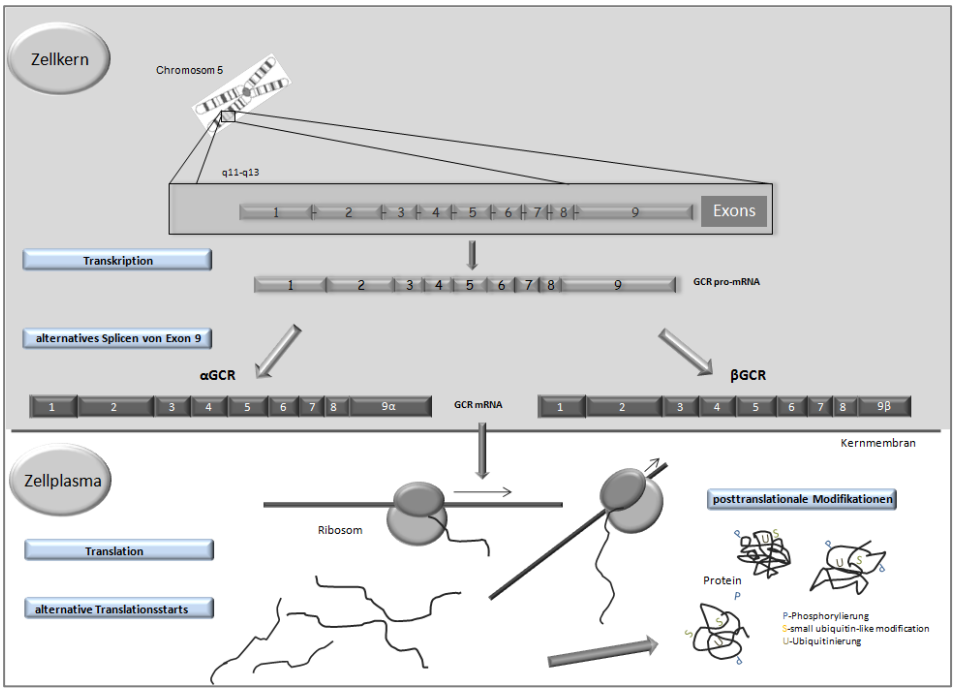

Abbildung I.4: Bildung unterschiedlicher Glucocorticoidrezeptor-varianten. Das humane GCR Gen setzt sich aus 9 Exons zusammen. Je nach Spleißvariante des Exons 9 entstehen 2 unterschiedliche Rezeptorisoformen, der α und der βGCR. Es werden weitere Rezeptorvarianten gebildet durch unterschiedliche Längen des N-Terminus, je nach Translationsstart oder durch post-translationale Modifikationen (nach Stahn und Buttgereit 2008).

Neben dem GCR existieren weitere Rezeptoren, welche der Steroidhormon-Rezeptor Familie, einer Gattung der Ligand induzierbaren Transkriptionsfaktoren, zugeordnet werden können, wie beispielsweise der Mineralocorticoidrezeptor, der Östrogenrezeptor oder der Androgenrezeptor [55]. Diese Rezeptoren weisen eine gemeinsame Proteinstruktur, bestehend aus drei Domänen mit individuellen Funktionen auf. Die N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-420) beinhaltet die Transaktivierungsdomäne AF 1 (activation function 1), welche direkt mit den Transkriptionsfaktoren und vielen anderen Cofaktoren zusammenwirkt [56-57]. Eine Funktionsstörung dieser Domäne führt zu einer verminderten Reportergenexpression [58-59]. Auf die N-terminale Domäne folgt die hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne (DBD; Aminosäuren 421-486), in welcher das typische Zink-Finger-Motiv (ermöglicht die Dimerisierung des Rezeptors) zweimal vorhanden ist. Diese Domäne vermittelt die spezifische Interaktion mit den DNA-Bindungselementen [60]. Am carboxyterminalen Ende befindet sich die Ligand-Bindungsdomäne (Aminosäuren 528-777),

bestehend aus 12 α-Helices, welche für die Bildung der hydrophoben Ligand-Bindungstasche verantwortlich ist. Neben der Bindung der Glucocorticoide ist diese Domäne auch an der Rezeptor-Dimerisierung, an der transkriptionellen Regulation und am Kerntransport des GCRs (die Domäne beinhaltet ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS)) beteiligt [44, 61-62]. Hier ist eine zweite, Hormon abhängige Transaktivierungsdomäne AF 2 lokalisiert, deren Konformationsänderung eine Interaktion mit Coaktivatoren oder Corepressoren ermöglicht [63-65]. Die Region zwischen der DNA-Bindungsdomäne und Ligand-Bindungsdomäne wird ‚hinge', also Scharnier oder Gelenk, genannt [66] (Abb. I.5).

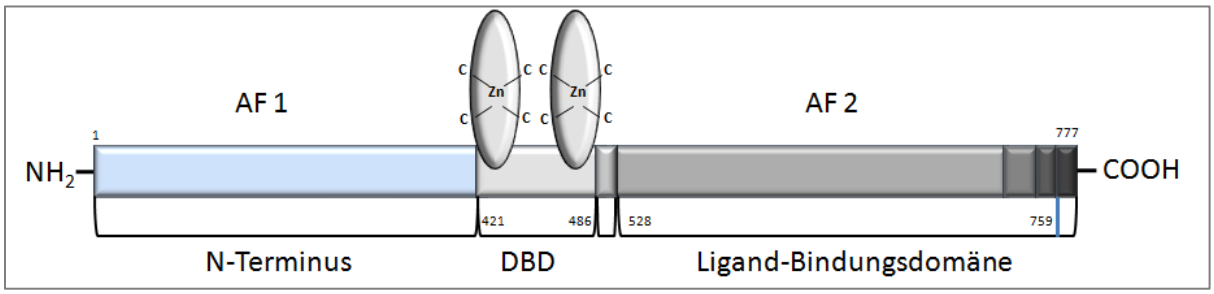

Abbildung I.5: Die Domänenstruktur des Glucocorticoidrezeptors. Der GCR ist aus drei unterschiedlichen Domänen aufgebaut. Die N-terminale Domäne beinhaltet eine Aktivierungsfunktion (AF 1), welche für die Regulation der Transkription verantwortlich ist. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) enthält die für eine Rezeptordimerisierung notwendigen Zink-Finger-Motive und vermittelt die spezifische Interaktion mit den DNA Bindungselementen. Die Ligandenbindungs-Domäne besteht aus 12 α-Helices und dient hauptsächlich der GC-Bindung.

1.2.3.2 Transaktivierung und Transrepression von Genen

Die Translokation des Hormon-Rezeptor Komplexes findet innerhalb von 30min statt [61]. Im Zellkern bindet der GC/GCR Komplex als Homodimer an zwei palindromische DNA-Bindungsstellen mit dem Motiv 5´-TGTTCT-3´, welche als GREs bezeichnet werden [43]. Diese Stellen sind in der Promotorregion der Zielgene lokalisiert. Durch die Bindung an positive GREs wird die Transkription von antientzündlichen Proteinen, wie z.B. IL 10, Annexin 1 oder IκB, und von Regulatorproteinen (z.B. Enzyme der Gluconeogenese), welche für den Stoffwechsel wichtig sind, aktiviert [15, 20, 67-68] (Abb. I.6 links). Dieser Prozess wird deshalb auch als „*Transaktivierung*" bezeichnet. Er wird jedoch ebenso für einen Großteil der Nebenwirkungen von Glucocorticoiden verantwortlich gemacht, da neben der erwünschten Synthese der antiinflammatorischen auch Regulatorproteine vermehrt exprimiert werden [23-25].
Andererseits vermitteln Glucocorticoide auch Effekte mittels der „*Transrepression*" [17]. Dies bezeichnet einen Prozess, bei welchem Monomere des GC/GCR Komplexes direkt oder indirekt mit Transkriptionsfaktoren interagieren. Dies führt nicht zu einer verminderten Synthese dieser Proteine sondern zu einer veränderten funktionellen Aktivität von z.B. AP-1 und NF-κB [15, 18], was letztendlich zu einer unterdrückten Expression von immunregulatorischen und entzündungsfördernden Mediatoren wie Zytokinen (IL1, IL2, TNF-α, IFN-γ) und Prostaglandinen führt [16, 22, 69]. Hier spielen mehrere Mechanismen eine wichtige Rolle (Abb. I.6 rechts):

- Transkriptionsfaktoren (TF) und GC/GCR Komplex konkurrieren um dieselben nukleären Coaktivatoren.

- Durch eine Protein-Protein Wechselwirkung zwischen GC/GCR Komplex und TF wird eine Bindung an die DNA verhindert.

- Die gesteigerte Synthese von IκB durch Wechselwirkungen zwischen GC/GCR Komplex und GREs führt in einigen Zellen zur Inhibition von NF-kB [70].

- Es existieren auch sogenannte negative GREs, die nach Bindung des GC/GCR Komplexes eine verminderte Transkription und somit verringerte Produktion von pro-inflammatorischen Proteinen, wie IL-1 oder IL-2 auslösen [21, 71].

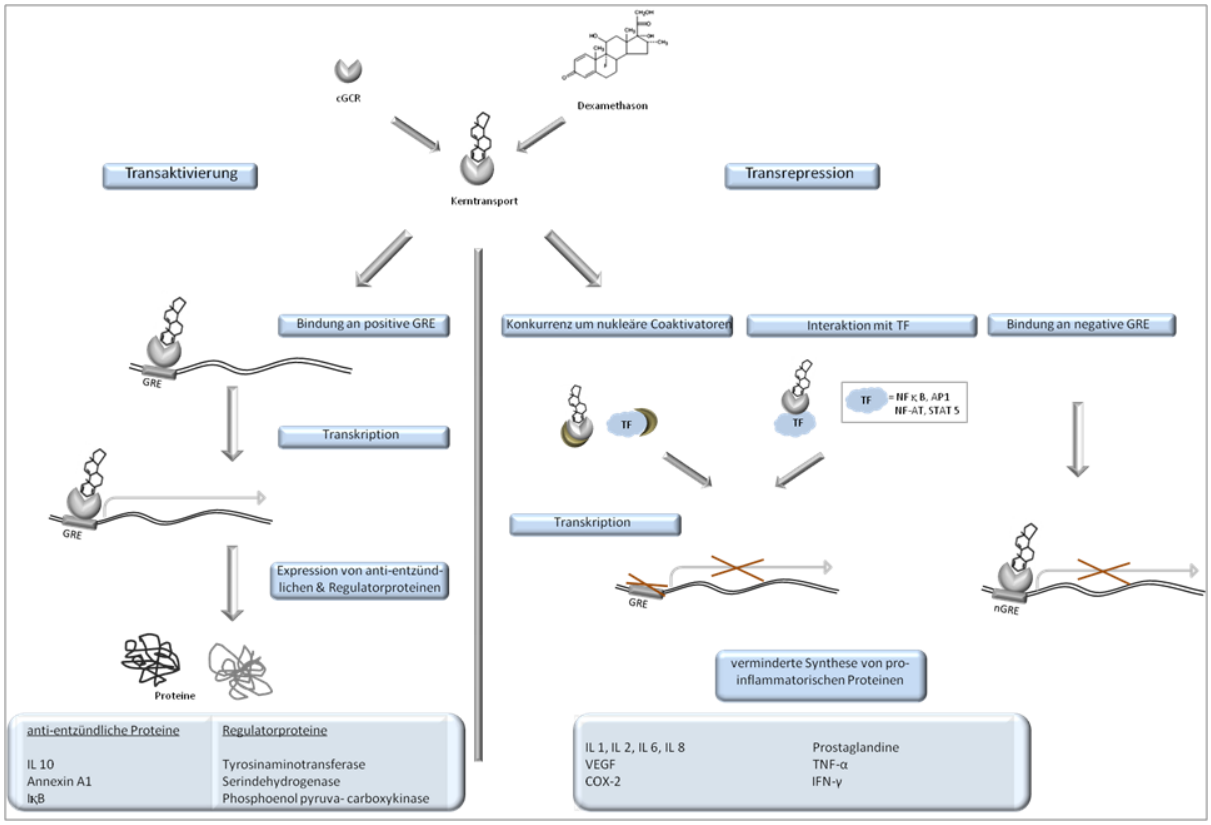

Abbildung I.6: Genomische Wirkmechanismen von Glucocorticoiden. Die Bindung vom GC/GCR Komplex an GREs induziert die Expression antientzündlicher Proteine und von Regulatorproteinen (Transaktivierung). Eine Inhibition der Synthese von pro-inflammatorischen Proteinen (Transrepression) entsteht durch: (I) Konkurrenz um nukleäre Coaktivatoren, (II) direkte oder indirekte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und (III) Bindung an negative GREs (nach Stahn und Buttgereit 2008).

Viele der gewünschten antientzündlichen Effekte werden durch die Transrepression vermittelt [24]. Entwicklungen hinsichtlich neuer Glucocorticoide haben das Ziel, die transaktivierende Wirkung zu minimieren während die Transrepression gesteigert wird (z.B. die Synthese der sogenannten *„selective glucocorticoid receptor agonists“* (SEGRAs)) [72-77].

Bei der genomischen Glucocorticoidwirkung handelt es sich um einen eher verzögert auftretenden Effekt. Es gibt unterschiedliche Einschätzungen der Mindestdauer bis eine Veränderung auf Proteinebene nachweisbar ist. Diese Zeitspanne setzt sich zusammen aus: (I) der Transportzeit der GC im Blut, (II) der Aktivierung des cGCRs nach Bindung, (III) dem Kerntransport des GC/GCR Komplexes, (IV) der Bindung an die GREs in der Promotorregion der Zielgene und letztendlich (V) dem transkriptionellen und translationalen Prozess, welcher die Synthese verschiedener Proteine zur Folge hat. Alles in allem dauert es aber mehrere Stunden bis Tage bis Auswirkungen auf zellulärer, Gewebe- oder Organebene auftreten. Einige klinische GC Effekte, vor allem nach Injektion von hohen GC Dosen, treten jedoch so schnell auf, dass diese nicht über den genomischen Wirkmechanismus von GC erklärbar sind [25, 78-82].

1.2.3.3 Schnelle Effekte von GC werden durch nicht-genomische Effekte vermittelt

Schnelle, klinische Effekte können aber auch innerhalb von Minuten nach Gabe von GC auftreten. In den letzten Jahren wurden verschiedene Einteilungen der nicht-genomischen Wirkmechanismen vorgeschlagen. So unterscheidet die Mannheim Klassifizierung zwei Kategorien: direkte Effekte, welche von den Steroiden selbst ausgelöst werden und indirekte Effekte, bei welchen die Steroide mittels Agonisten schnelle Wirkungen vermitteln [79]. Haller *et al.* schlagen hingegen eine Einteilung in 5 Klassen vor: Effekte auf Membranlipide, Effekte auf Membranproteine, Effekte auf cytoplasmatische Proteine, Protein-Protein Wechselwirkungen und Interaktionen mit Glucocorticoidtransportern [83]. Die in dieser Arbeit präferierte Einteilung ist die nach Buttgereit *et al*. [78]. Dabei werden 3 Klassen nicht-genomischer Wirkmechanismen unterschieden: (I) Effekte welche durch den cGCR vermittelt werden, (II) unspezifische Effekte durch Wechselwirkung der GC mit Membranen und (III) durch den membranständigen GCR (mGCR) vermittelte Effekte (Abb. I.7).

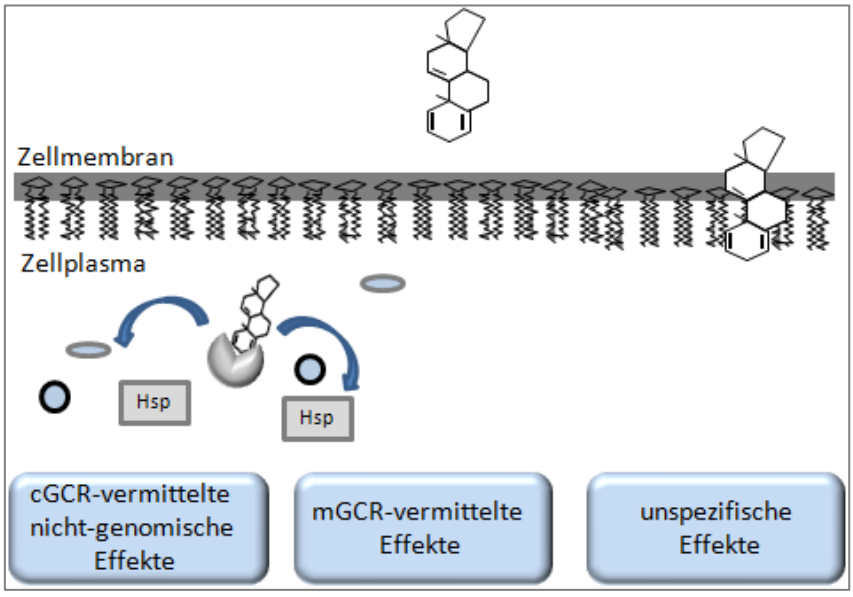

Abbildung I.7: Nicht-genomische Wirkmechanismen von Glucocorticoiden. Die nicht-genomischen GC Effekte unterscheidet man laut Buttgereit *et al.* in: (I) cGCR vermittelte nicht-genomische Effekte, (II) via membranständigen GCR übertragene und (III) durch unspezifische Interaktion mit Zellmembranen ausgelöste Effekte.

1.2.3.4 cGCR vermittelte nicht genomische Wirkmechanismen von GC

Der cytosolische Glucocorticoidrezeptor liegt, wie in Abschnitt 1.2.3.1 beschrieben, im Zellplasma als Multiproteinkomplex, bestehend aus Hitzeschockproteinen (Hsp), Immunophilinen, (Co)Chaperonen und Kinasen des MAPK Signalsystems, vor. Die Bindung des Glucocorticoids führt zur Dissoziation dieser Signalmoleküle vom GCR-Multiprotein-Komplex, wobei die nun frei verfügbaren Mediatoren die Auslöser schneller GC-Effekte darstellen [39].
Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Freisetzung von Arachidonsäure durch GC inhibiert werden kann. Arachidonsäure ist ein essentieller Mediator des Zellwachstums und verschiedener metabolischer und entzündlicher Reaktionen. Die Freisetzung wird mittels unterschiedlicher Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren, MAP-Kinasen oder Lipocortin 1) streng kontrolliert. Die GC abhängige Hemmung dieser Freisetzung erwies sich als cGCR abhängig (sensitiv gegenüber RU486, welches den cGCR mit dreifach höherer Affinität als Dexamethason bindet) aber Transkriptions- unabhängig (Actinomycin-D insensitiv) [80, 84]. Croxtall *et al.* vermuteten, dass die erwähnten (Co)Chaperone des Multiproteinkomplexes als Signalmoleküle fungieren, welche diesen Effekt auf die Arachidonsäurefreisetzung vermitteln [80]. Über den cGCR werden demzufolge nicht nur die klassischen genomischen, sondern auch die schnellen nicht genomischen Wirkungen von Glucocorticoiden vermittelt [25].

1.2.3.5 Unspezifische Effekte entstehen durch Wechselwirkungen mit zellulären Membranen

Besonders bei einer „Hochdosis“ GC Therapie mit 30–100mg Prednisolonäquivalent/Tag (siehe Abschnitt 1.2.1) können GC die physikochemischen Eigenschaften von biologischen Membranen (im Besonderen von Plasma- und Mitochondrienmembranen) verändern, wahrscheinlich dadurch, dass sie in diese Membranen eingelagert werden. Dadurch kommt es zur Funktions- und Aktivitätsänderung von membranassoziierten Proteinen, was wiederum Auswirkungen auf z.B. die Lipidperoxidierung und die Membranpermeabilität hat [33, 78]. Bei Immunzellen kommt es aufgrund der Wechselwirkung von GC mit Plasmamembranen zu einem rasch verminderten Natrium- und Calcium-Transport über diese Membranen, was wiederum zur Entzündungshemmung und Immununterdrückung beitragen soll.
Mitochondrienmembranen werden dahingehend beeinflusst, dass GC das mitochondriale proton-leak vergrößern und damit die ATP Produktion der Zelle vermindern [84]. Diese wird zusätzlich durch die direkte Inhibition der oxidativen Phosphorylierung durch GC reduziert. Dabei ist ATP zur Erhaltung der Grundprozesse als auch der speziellen Effektorfunktionen, wie z.B. Phagozytose, Zytokinsynthese, Migration, Antigenproduktion und -präsentation, von Immunzellen unerlässlich. Die Beeinträchtigung des ATP Haushaltes von Immunzellen erklärt demzufolge auch die schnellen Effekte von „Hochdosis“ GC-Therapien auf die Entzündungshemmung und Immununterdrückung.

1.2.3.6 Spezifische nicht genomische GC Effekte werden durch den membranständigen GCR ausgelöst

Eine letzte, von den bereits erwähnten unabhängige Hypothese geht davon aus, dass einige der schnellen GC Effekte durch einen membranständigen Glucocorticoidrezeptor (mGCR) vermittelt werden. Im folgenden Abschnitt sind dessen Entdeckung und der aktuelle Stand der Forschung aufgezeigt.

1.2.4 Der membranständige Glucocorticoidrezeptor

In den letzten Jahren wurden immer mehr Beweise für die Existenz und Funktionalität von membranständigen/ oder –gebundenen Steroidrezeptoren, wie beispielsweise für Mineralocorticoide, Hormone der Gonaden oder Vitamin D gefunden [33, 78-81]. Das Vorkommen eines Glucocorticoidrezeptors, welcher in der Membran verankert oder an der Membran angelagert ist, wurde erstmals in Nervenzellmembranen von Amphibien und in Lymphomzellen gezeigt [85-86]. Mittels [3H] Cortison wiesen Orchinik *et al.* bereits im Jahr 1991 einen membranständigen Corticosteroidrezeptor im Gehirn nach[86].

1.2.4.1 Nachweismethode mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung

Erst viel später gelang es, den membranständigen Glucocorticoidrezeptor (mGCR) erstmals mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung auf humanen PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) nachzuweisen [33, 87] (Abb. I.8).

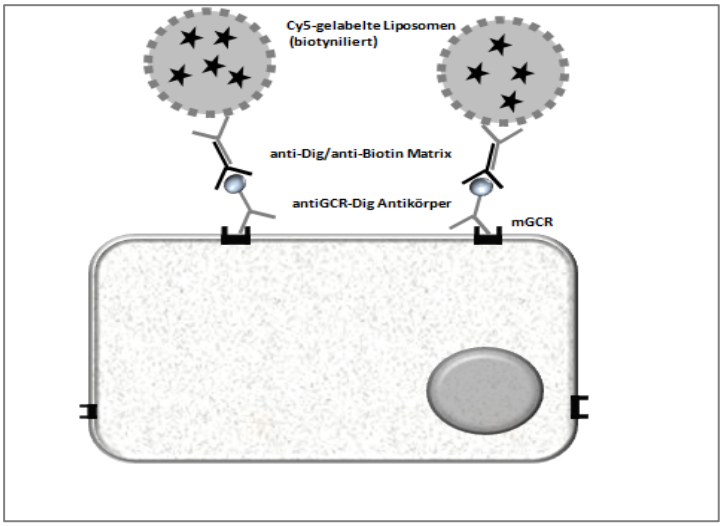

Abbildung I.8: Nachweis von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren mittels hochsensitiver Immunfluoreszenz Färbung. Zum Nachweis des mGCR-Proteins wurde der monoklonale, Dig-konjugierte Antikörper antiGCR 5E4 verwendet. Nach Zugabe und Inkubation mit der anti-Dig/Anti-Biotin Matrix wurden carboxyfluoresceinhaltige (Cy5) magnetofluoreszente Liposomen als indirektes Sekundärfärbereagenz verwendet, welche das Fluoreszenzsignal bis zu 1000-fach verstärken können.

Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu konventionellen Färbetechniken, liegt darin, dass mit Hilfe von Liposomen die Fluoreszenzintensität bis zu 1000-fach gesteigert wird [88], was einen Nachweis von wenigen Molekülen pro Zielzelle ermöglicht.

1.2.4.2 Vorkommen und klinische Relevanz des mGCRs

Mit Hilfe dieser hochsensitiven Immunfluoreszenzfärbung konnte der mGCR insbesondere auf humanen B-Zellen und Monozyten von gesunden Spendern nachgewiesen werden [87]. Bartholome *et al.* zeigten darüber hinaus, dass eine Immunstimulation von humanen Monozyten mit Lipopolysaccharid (LPS) den prozentualen Anteil mGCR positiver Zellen erhöht (Abb. I.9). Der Proteintransportinhibitor Brefeldin A kann diese Steigerung jedoch verhindern [87].

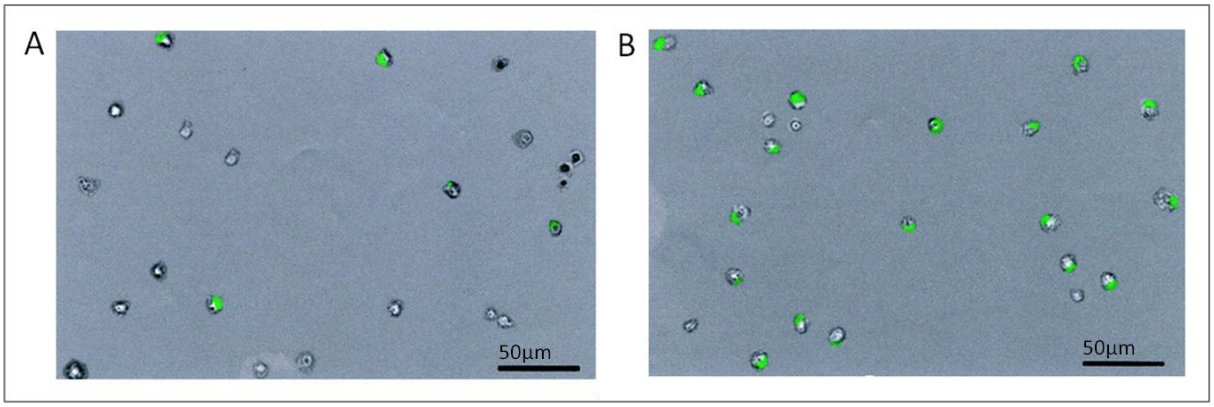

Abbildung I.9: Nachweis des mGCR auf humanen Monozyten. Zum Nachweis des mGCR-Proteins wurden mittels MACS Sortierung humane Monozyten aus PBMCs isoliert. Dargestellt ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesenen mGCR in A) unstimulierten und B) LPS stimulierten Monozyten (nach Bartholome 2004 [87]).

Nicht nur eine *in vitro* Stimulation hat eine gesteigerte mGCR Expression zur Folge, auch konnte für Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) eine erhöhte Zahl an mGCR positiven Monozyten und B-Lymphozyten nachgewiesen werden, welche mit den verschiedenen Parametern der Krankheitsaktivität positiv korreliert [87]. Weiterhin wurde eine Steigerung der mGCR Expression auf Monozyten und B-Lymphozyten von Patienten mit ankylosierender Spondylitis festgestellt, welche jedoch nicht mit der Krankheitsaktivität zusammenhängt [89]. Patienten mit systemischem Lupus erythematodes besitzen einen hohen Anteil an mGCR positiven Monozyten, welcher sogar höher als bei Patienten mit aktiver RA ist [90]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass der mGCR eine Rolle bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Krankheiten spielt [91].

Mit der hochsensitiven Immunfluoreszenzfärbung lässt sich der mGCR nicht auf der Membranoberfläche von T-Zellen nachweisen. Jedoch spielt ein membranassoziierter GCR auch bei den schnellen, nicht genomischen immunsuppressiven Effekten von GC auf diese Zellen eine wichtige Rolle [92-94]. Zwei Tyrosinkinasen, die p56lck (Lck) und p59fyn (Fyn) Kinase wurden als Ziel nicht genomischer GC Effekte identifiziert [92]. Beide Kinasen werden von T-Zellen exprimiert und sind essentiell für die T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelte Signalübertragung, was letztendlich die Produktion von Zytokinen, die Proliferation oder die Differenzierung dieser Zellen auslöst [95-98]. Sowohl Lck als auch Fyn sind mit dem TCR

Komplex verbunden, wobei Lck an CD4 oder CD8 Co-Rezeptoren bindet, während Fyn mit CD3 assoziiert [99-101]. Mittels Peptid-Microarray (PepChip™) wurden schnelle GC Effekte untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Phosphorylierung von Lck/Fyn Konsensussubstraten vermindert ist. Eine Stimulation von T-Zellen mit GC führt zu einer rezeptorabhängigen, verringerten Kinaseaktivität von Lck und Fyn sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [92]. Löwenberg *et al.* vermuten den folgenden molekularen Mechanismus der GC vermittelten Inhibition des TCR Signalweges: Der membranassoziierte GCR ist ein Teil des TCR-Multiprotein-Komplexes, welcher auch HSP90, Lck und Fyn beinhaltet. Eine Behandlung von T-Zellen mit GC wie Dexamethason führt zur Dissoziation des GCR-Multiproteinkomplexes vom TCR, was eine verminderte Phosphorylierung von TCR Signalmolekülen (z.B. p38 MAPK, ERK, Proteinkinase B und Proteinkinase C), also demzufolge eine unterdrückte TCR Signalübertragung und eine Umlagerung der Lck und Fyn Kinasen innerhalb der Zelle zur Folge hat [102] (Abb. I.10).

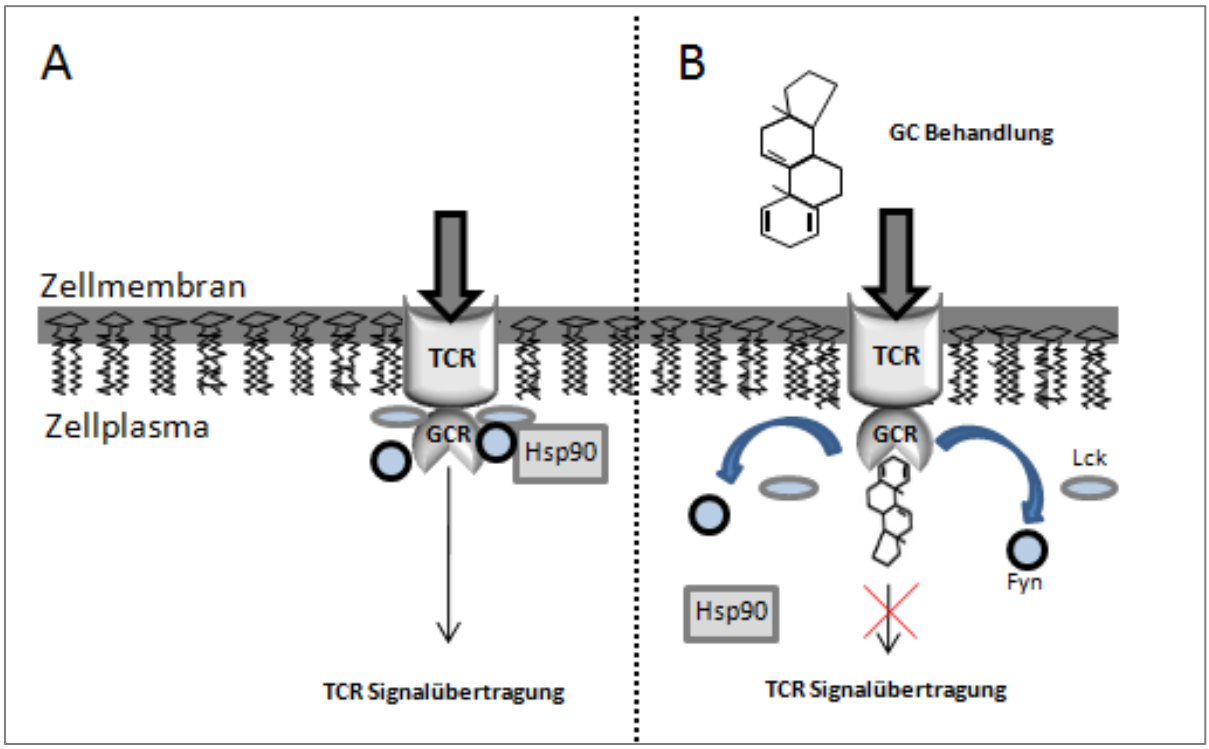

Abbildung I.10: Nicht genomische GC vermittelte Immunosuppression in T-Zellen. Der TCR-Komplex setzt sich aus den essentiellen Kinasen Lck und Fyn zusammen. Eine Aktivierung des TCR führt zur Aktivierung dieser Kinasen und bewirkt eine Downstream TCR Signalkaskade (A). Eine Kurzzeitbehandlung von T-Zellen mit Glucocorticoiden führt zum Auflösen des Multiprotein-Komplexes was eine verringerte Signalweiterleitung vermittelt durch den TCR zur Folge hat (B). (nach Löwenberg 2006 [102]).

Der mGCR scheint nicht nur bei der Pathogenese verschiedener chronisch entzündlicher Erkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen. Es wird kontrovers diskutiert, ob die Hochregulation des Rezeptors nach Immunstimulation oder im Fall einer entzündlichen Erkrankung als möglicher Schutzmechanismus des Körpers dient. So wurde auch gezeigt, dass eine Apoptose mittels GC auf einen mGCR vermittelten Mechanismus beruht [85].

1.3 Vertreter der nukleären Hormonrezeptoren mit membranständigen Isoformen

Insgesamt gibt es 18 Mitglieder in der Familie der nukleären Hormonrezeptoren, welche in Klasse I und Klasse II unterteilt werden. Wie der Glucocorticoidrezeptor werden auch der Östrogen- und der Progesteronrezeptor, welche im folgenden Kapitel genauer betrachtet werden, der Klasse I zugeordnet [103].

1.3.1 Der humane Östrogen- und Progesteronrezeptor

Die menschliche Sexualentwicklung und das Sexualverhalten, Reproduktionsprozesse sowie die Zellteilung und –differenzierung werden u.a. von dem endogenen Hormon 17-β-Östradiol gesteuert. Der Östrogenrezeptor alpha (ERα), an welchen das Östradiol bindet, wurde erstmals im Jahr 1962 isoliert und auch kloniert [104-105]. Erst mehr als 3 Jahrzehnte später wurde eine alternative Isoform, der Östrogenrezeptor beta (ERβ) kloniert [106]. Neben dem endogenen Hormon wurden auch synthetische Steroide hergestellt. Seit den 70er Jahren wird z.B. der selektive Östrogenrezeptor Modulator Tamoxifen in der Medizin zur Therapie von Brustkrebs genutzt [107-109].
Der physiologische Ligand des Progesteronrezeptors (PR), welcher in den 70er Jahren entdeckt wurde [110], ist das weibliche Geschlechtshormon Progesteron. Dieses, zu den Gestagenen zuzuordnende Gelbkörperhormon, ist verantwortlich für die Entwicklung des Embryos und fungiert in einigen Steroid-produzierenden Zellen der Gonaden als Ausgangsstoff für die Androgen- und Östrogensynthese. Progesteron werden eine Vielzahl weiterer positiver Effekte auf den Körper zugeschrieben, wie beispielsweise die Stimulation der Knochenregeneration, die Unterdrückung einiger für den Kollagenabbau verantwortlichen Enzyme sowie eine schlaffördernde Wirkung.

1.3.1.1 Proteinstruktur, Isoformen und Signalübertragung

Die drei beschriebenen Steroidhormonrezeptoren, GCR, ER und PR weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie auf, was eine hoch konservierte 3 dimensionale Proteinstruktur zur Folge hat [111]. Wie bereits in Abschnitt 1.2.3.1 beschrieben, besteht diese Proteinstruktur aus drei Domänen. Von der Transaktivierungsdomäne AF 1, welche in der N-terminalen Region gelegen ist, existieren mehrere Spleißvarianten bei dem Östrogenrezeptor, welche die transkriptionelle Aktivität beeinflussen [111-112]. Für den Progesteronrezeptor wurden zwei Isoformen (A und B) beschrieben, wobei die A-Isoform sowohl als Inhibitor der B-Isoform, als auch als Inhibitor anderer Rezeptoren der Familie (Östrogenrezeptor, Glucocorticoidrezeptor oder Mineralocorticoidrezeptor) beschrieben wurde [113-114].
Die DNA- Bindungsdomäne, welche die zwei Zink-Finger-Motive beinhaltet, dient nicht ausschließlich der Bindung der DNA sondern auch der Dimerisierung von Rezeptoren. Dadurch können Homo- und Heterodimere der Rezeptoren gebildet werden. Weiterhin sind

zwei α-Helices in diesem Bereich angesiedelt, wobei eine Helix direkt an die große Furche der DNA angreift während die andere Helix den ganzen Komplex stabilisiert [115-116] (Abb.I.11).

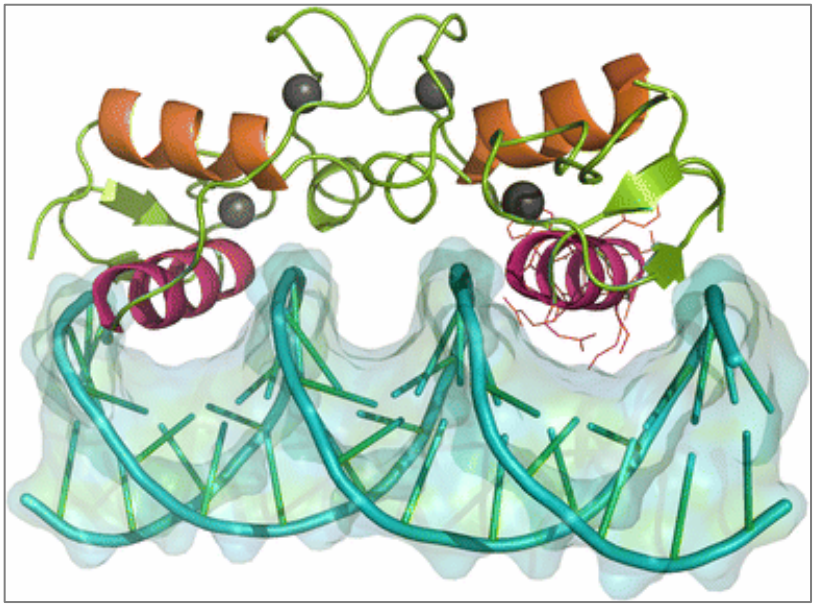

Abbildung I.11: Bindung des humanen Progesteronrezeptors als Dimer an die DNA. Als graue Kugel dargestellt sind die Zn^{2+} Ionen, welche das typische Zink-Finger-Motiv bilden. Die DNA-Bindungsdomäne des PR beinhaltet weiterhin zwei α-Helices. Helix1, hier lila dargestellt, bildet den direkten Kontakt zu den Basen der großen Furche der DNA. Die Helix2, hier orange abgebildet, befindet sich oberhalb der Helix1 und stabilisiert den gesamten Komplex.
Die Abb. basiert auf einer Röntgenstrukturanalyse von Roemer *et al.* (2006) [115]. (http://www.rcsb.org, access code pdb2c7a, nach Ellmann 2009 [103]).

Am carboxyterminalen Ende befindet sich die Ligand-Bindungsdomäne. Hier ist eine zweite, Hormon abhängige Transaktivierungsdomäne AF 2 lokalisiert, deren Konformationsänderung eine Interaktion mit Coaktivatoren oder Corepressoren ermöglicht. Die Ligand-Bindungsdomänen der Rezeptoren, welche aus 12 α-Helices bestehen (diese dienen der Bildung der hydrophoben Ligand-Bindungstasche), weisen jedoch strukturelle Unterschiede auf, wodurch ihnen auch verschiedene Funktionen inneliegen [117-121].
Neben den acht codierenden Exons des ERα existieren acht weitere, nicht translatierte 5´-Exons, welche, neben anderen Mechanismen, zur Entstehung von bis zu fünf unterschiedlichen ERα Isoformen beitragen. Zu den anderen Mechanismen zählen z.B. alternative Transkriptionsstartpunkte, das Überspringen oder das Verdoppeln bestimmter Exons, alternatives Spleißen der codierenden Exons oder das Verwenden bzw. der Einbau sogenannter intronischer Exons (für ERα das Exon S, befindlich zwischen den Exons 3 und 4) [122-125]. Die β-Isoformen werden von den Exons 1 bis 7, fünf alternativen Exons 8s, sieben zusätzlichen nicht translatierten 5´-Exons und einem intronischen Exon M (befindlich zwischen den Exons 4 und 5) codiert [122, 126].
Die Genstruktur des humanen Progesteronrezeptors, von welchem vier Isoformen bekannt sind [122], ist vergleichbar: die codierenden Exons 1-8 bilden die Grundstruktur, wobei auch hier intronische Exons identifiziert wurden (sowohl Exon T und Exon S zwischen Exon 3 und 4 [125, 127], als auch die Exons i45a und b zwischen den Exons 4 und 5 [128].
Die Signalübertragung erfolgt für beide Rezeptoren ebenfalls mittels eines genomischen Wirkmechanismus [129-134](vgl. Abschnitt 1.2.3.2):

- Die Liganden können aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften leicht durch Zellmembranen in die Zelle eindringen.

- Im Cytosol binden die Liganden an ihren Multiprotein-Rezeptorkomplex wodurch eine Konformationsänderung und eine Freisetzung von z.B. HSPs stattfindet.

- Nach Freilegung einer Kernlokalisierungssequenz entstehen Rezeptordimere, welche in den Zellkern transportiert werden.

- Durch Bindung des Rezeptordimers oder anderer Cofaktoren an die entsprechende Zielsequenz erfolgt die transkriptionelle Regulation der Zielgene [135-137].

Für beide, sowohl den Östrogen- als auch für den Progesteronrezeptor, existieren jedoch ebenfalls schnelle, nicht genomische Effekte.

1.3.1.2 Durch Östradiol vermittelte nicht genomische Effekte

Einige Effekte, welche durch Östradiol vermittelt werden, wurden wiederholt nach so kurzer Zeit festgestellt, als dass sie nicht über den genomischen Mechanismus, also über transkriptionelle Regulation vermittelt werden können. Das Vorkommen einer membranständigen Isoform des Rezeptors (mER) wird vermutet [138], wobei verschiedene Formen postuliert werden. So kann es sich einerseits um einen vollständigen ER [139], eine Isoform [140] oder um einen vollkommen unterschiedlichen Rezeptor [141] handeln. Es wurde gezeigt, dass Antikörper, welche den klassischen ERα nachweisen, ebenfalls ein Membranprotein auf unterschiedlichen Zellen binden (Norfleet 1999). Pedram *et al*. konnten außerdem zeigen, dass Zellen aus ERα/ERβ Knockout Mäusen nicht in der Lage sind, Östrogen auf der Membranoberfläche zu binden [139].
Der ER beinhaltet jedoch weder eine Transmembran- noch eine intrinsische Kinasedomäne, welche eine Signalübertragung durch die Plasmamembran erklären würden. Es ist deshalb am wahrscheinlichsten, dass eine posttranslationale Modifikation, wie beispielweise Myristoylierung oder Palmitoylierung, oder aber eine Wechselwirkung mit anderen Proteinen für den Transport und die Verankerung des ER in der Membran verantwortlich sind [103].
In RNAi-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass bei der Membranlokalisierung des ERs sowohl das Adapterprotein Shc als auch der Insulin-like growth factor I receptor eine essentielle Rolle spielen [142]. Auch lassen sich mER in calveolae rafts (spezielle Form von Lipid Rafts wobei das Protein Caveolin-1 ein wichtiges Strukturelement bildet) nachweisen [143]. In Zellen, denen Caveolin-1 fehlt, lässt sich der ERα jedoch nur im Zellkern nachweisen [144]. Es zeigte sich, dass im Fall des mERs eine Palmitoylierung des Cysteins 447 (befindlich in der Ligand-Bindungsdomäne) für einen Transport und/oder die Verankerung in der

Membran essentiell ist [145-146]. Die Palmitoylierung ist ein Prozess der posttranslationalen Modifikation, bei welchem Palmitat an Cysteinreste gebunden wird. Viele membrangebundenen Proteine unterliegen einer Palmitoylierung, da diese hauptsächlich der Interaktion von Proteinen mit Membranen dient. In beiden ER Isoformen ist ein Palmitoylierungsmotiv, bestehend aus insgesamt 9 Aminosäuren, identifiziert worden, wobei ähnliche Motive auch in anderen Steroidrezeptoren vorkommen.
Es ist bereits bekannt, dass schnelle mER Signale durch Assoziation der Rezeptoren mit G-Proteinen und anderen Adaptorproteinen entstehen. Wie genau diese Aktivierung erfolgt ist jedoch noch unklar [147-149]. Verschiedene Kinase vermittelte Signalwege werden dabei postuliert und kontrovers diskutiert [103, 150-154].

1.3.1.3 Nicht genomische Progesteron Wirkung

Wie bereits für den GCR oder den ER beschrieben, weist auch der Progesteronrezeptor (auch Progestinrezeptor genannt, nach dem Namen für synthetische Gestagene) schnelle, nicht genomische Effekte auf. Auch von diesem Rezeptor existiert eine membranständige Variante, was durch verschiedene Studien gezeigt wurde [155-157]. Eine weitere Gemeinsamkeit mit dem mER ist ein ähnliches Palmitoylierungsmotiv, welches sich wiederum innerhalb der Ligand-Bindungsdomäne des PRs befindet [145]. Zhu *et al*. haben in den Ovarien von Meerforellen einen hormonregulierten, membranständigen PR identifiziert, welcher Ähnlichkeit in Form der typischen 7 Transmembrandomänen mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren aufweist [158]. Mittlerweile sind mehrere Isoformen der mPR bekannt, wobei die α- und die β-Variante eine sehr hohe Sequenzhomologie über verschiedene Spezies hinaus aufweisen [159-160], von denen sich der mPRγ jedoch deutlich unterscheidet. Diese drei Rezeptorformen werden z.B. von humanen MCF-7 und anderen Krebszellen exprimiert, wobei bereits bekannt ist, dass die Genexpression des mPRα bei Patienten mit Brustkrebs höher ist als in normalem Brustgewebe [161-162].
Nicht genomische Steroid-Effekte, welche durch ebendiese spezifischen Membran-Rezeptoren vermittelt werden, unterliegen vermutlich einer nachgeschalteten Signaltransduktion mittels sekundären Botenstoffs, wobei dieser jedoch noch nicht genauer charakterisiert wurde. Auch scheinen Interaktionen unterschiedlichster Art von großer Bedeutung zu sein. Nicht nur die Wechselwirkungen zwischen nukleären und membranassoziierten, sondern auch anderen Rezeptoren oder der Signaltransduktion an sich spielen hier eine Rolle. So wurde sowohl für den mPRα als auch für den mPRβ, welche in Gebärmutterzellen von Schwangeren exprimiert werden, eine Verbindung mit einer Untereinheit eines inhibitorischen G-Proteins nachgewiesen. Eine Aktivierung des mPRs hatte eine gesteigerte Phosphorylierung der p38 MAPK, aber nicht der p44/42 MAPK zur Folge. Zudem führt das Induzieren des mPR Signals zu einer Aktivierung des nukleären PRs, was eine Wechselwirkung dieser bestätigt [163]. Auch andere Studien zeigten eine direkte Signalweiterleitung mittels mPRs über eine signifikante Aktivierung von MAP-Kinasen [164-165].

Zusammengefasst existieren also mehrere Steroidrezeptoren, für die auch eine membranassoziierte Variante postuliert oder bereits nachgewiesen wurde. In allen Fällen scheint eine Signalweiterleitung über einen sekundären Botenstoff sehr wahrscheinlich, wobei jedoch der Botenstoff selbst bzw. der genaue Signalweg noch weitgehend ungeklärt sind.

Fragestellung

1.4 Ableitung der Fragestellung

Ein genaues Verständnis der molekularen Mechanismen von Glucocorticoidwirkungen ist die Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer Medikamente, welche stärker ausgeprägte antientzündlichen und immunsupprimierende Wirkungen und/oder weniger unerwünschte Nebenwirkungen aufweisen. In diesem Zusammenhang spielt die Erforschung des membranständigen Glucocorticoidrezeptors (mGCR) eine zentrale Rolle. Wir konnten bereits dessen klinische Relevanz aus folgenden Beobachtungen ableiten: (i) Die mGCR-Expressionsfrequenz bei Monozyten korreliert bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis positiv mit der Krankheitsaktivität; (ii) Patienten mit systemischem Lupus Erythematosus zeigten einen Zusammenhang zwischen mGCR-Expressionsfrequenz auf Monozyten und Glucocorticoid-Behandlung, und (iii) auch bei Patienten mit ankylosierender Spondylitis konnte eine erhöhte mGCR-Expressionsfrequenz im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden.
Bei dem geplanten Forschungsvorhaben sollten daher die Klärung von Herkunft und funktioneller Relevanz der identifizierten mGCR im Vordergrund stehen.
Das Vorkommen einer membranständigen Isoform anderer nukleärer Hormonrezeptoren (z.B. Östrogen- oder Progesteronrezeptor) wird ebenfalls vermutet, jedoch werden verschiedene Formen postuliert. Da der Antikörper, welcher den cytosolischen Glucocorticoidrezeptor (cGCR) detektiert auch für den spezifischen Nachweis des mGCRs Anwendung findet, wurde folgende Fragestellungen im Detail erörtert:

- Handelt es sich bei dem mGCR um eine spezielle Spleißvariante des cGCRs (Ein-Gen-Hypothese)?
    - Welche Effekte hat eine *temporäre* Herabregulation des cGCRs auf die Expression des mGCRs?
    - Lassen sich davon die Effekte einer *stabilen* Herabregulation des cGCRs Unterscheiden?

Da für die anderen nukleären Hormonrezeptoren eine funktionelle Aktivität postuliert wird, soll auch für den mGCR folgende Fragestellung erörtert werden:

- Vermittelt der mGCR nach Aktivierung schnelle Effekte der Signalweiterleitung über Kinaseaktivität?
- Entsteht durch eine Aktivierung des mGCRs ein verändertes Genexpressionsmuster im Vergleich zu einer Aktivierung durch den cGCR?

Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle II.1: Zelllinien

Zelllinie	Spezifikation	Hersteller	ATCC® Nummer
HEK 293T	Organismus: Homo sapiens Herkunft: Niere Zelltyp: Epithelzelle Wachstumsverhalten: adhärent	American Type Culture Collection (ATCC)	CRL-11268
HeLa	Organismus: Homo sapiens Herkunft: Gebärmutter Zelltyp: Epithelzelle Wachstumsverhalten: adhärent	American Type Culture Collection (ATCC)	CCL-2
Jurkat E6-1	Organismus: Homo sapiens Herkunft: Blut Zelltyp: T-Lymphozyt Wachstumsverhalten: in Suspension	American Type Culture Collection (ATCC)	TIB-152

Tabelle II.2: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Bakterienspezies	Spezifikation	Hersteller/ Vertrieb
Top 10	*E. coli*	Chemisch kompetente Zellen	Invitrogen GmbH

2.1.2 Medien

Tabelle II.3: Zellkulturmedien und Supplementierungen

Medium	Spezifikation	Hersteller/ Vertrieb
DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium)	Medium für Säugerzellen	Invitrogen GmbH
RPMI Media 1640	Medium für Säugerzellen und humane Lymphozyten	Invitrogen GmbH

Die Medien wurden mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS), 100U/ml Penicillin und 100U/ml Streptomycin und 50mM β-Mercaptoethanol (2-ME) versetzt.

Tabelle II.4: Bakterienmedien und Zusätze

Substanz	Hersteller/ Vertrieb
Agar	Sigma Aldrich Chemie GmbH
LB (engl. Lysogeny broth) Medium Kapseln	MP Biochemicals
SOC-Medium	Sigma Aldrich Chemie GmbH

Flüssiges LB (engl. lysogeny broth) Medium wurde entsprechend der Herstellerangaben angesetzt und 20min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung der LB-Platten wurde dem Medium 1,5% Agar zugesetzt. Zur Selektion transformierter *E. coli* Bakterien wurde resistenzgenabhängig Ampicillin (100µg/ml) dem <60°C warmen Medium zugesetzt.

2.1.3 Antikörper, Antikörperkonjugate und Beads

Tabelle II.5: Antikörper, Antikörperkonjugate und Beads

Antigen	Klon	Klonalität	Spezies/Isotyp	Konjugat	Hersteller/ Vertrieb
Kaninchen-IgG	RG-96	monoklonal	Maus IgG1	HRP	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Maus-IgG	-	polyklonal	Maus Serum	HRP	Promega GmbH
ß-Aktin	AC-74	monoklonal	Maus IgG2a	-	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Glucocorticoid-rezeptor	5E4	monoklonal	Maus IgG1	-	Timea Berki [166]

Antigen	Klon	Klonalität	Spezies/Isotyp	Konjugat	Hersteller/ Vertrieb
Glucocorticoid-rezeptor	5E4	monoklonal	Maus IgG1	Dig	Timea Berki
Anti-Dig/Anti-Bio-Matrix					Miltenyi Biotec GmbH
pan-Cadherin	CH-19	monoklonal	Maus IgG1	-	Abcam
phospho p38	-	polyklonal	Kaninchen IgG	-	Cell Signaling
p38	-	polyklonal	Kaninchen IgG	-	Cell Signaling
phospho p44/42	-	polyklonal	Kaninchen IgG	-	Cell Signaling
p44/42	137-F5	monoklonal	Kaninchen IgG	-	Cell Signaling
phospho JNK	81-E11	monoklonal	Kaninchen IgG	-	Cell Signaling
JNK	-	polyklonal	Kaninchen IgG	-	Cell Signaling
hCD14	TM1	monoklonal	Maus IgG	FITC	DRFZ
hCD14	TÜK4	monoklonal	Maus IgG2a	Micro Beads™	Miltenyi Biotec GmbH
hCD4	M-T466	monoklonal	Maus IgG1	Micro Beads™	Miltenyi Biotec GmbH

2.1.4 Plasmide, siRNA und Vektoren

Tabelle II.6: Plasmide und Vektoren

Plasmide und Vektoren	Hersteller/Vertrieb
pGRE-Luc	Clontech Laboraties, Inc.
pRL-CMV	Promega GmbH
pGL3-Control	Promega GmbH
pGL3-Basic	Promega GmbH
pMax-GFP	Lonza Group Ltd.
pLL3.7	Addgene, Inc.
psPAX2	Addgene, Inc.
pCL-VSVG	Addgene, Inc.
pLL 3.7 scr	Karolina Tykwinska
pLL GCR sh1	Cindy Strehl
pLL GCR sh2	Cindy Strehl
pLL GCR sh3	Cindy Strehl

Tabelle II.7: siRNA Sequenzen

siRNA	Exon mit komplementärer Sequenz	Oligonukleotidsequenzen
GCR [1]	2	AAgAggAggAgCUACUgUgAA
GCR [2]	2	AAgCUUUCCUggAgCAAAUAU
GCR [3]	6	AAgUgCAAACCUgCUgUgUUU
GCR [4]	5	CAgACTCAACTTggAggATCA
GCR [5]	2	CggTggCAATgTgAAATTgTA
GCR [6]	8	AAggACggTCTgAAgAgCCAA
GCR [7]	5	gAggATCATgACTACgCTCAA
GCR [8]	9	CCCAACAATCTTggCgCTCAA
GCR [9]	3	CTCCTCCATCCAgCTCCTCAA
GCR [10]	4	CAggCTggAATgAACCTggAA
GCR [11]	7	CTgCATgTACgACCAATgTAA
GCR [12]	1	AACTAggAAATTCACCATAAT
GCR [13]	1	AAgAAgACTTTgCTTCATTAA

Tabelle II.8: shRNA Sequenzen der Vektoren

Vektoren	enthaltene shRNA Oligonukleotidsequenzen
pLL 3.7 scr	5´-TgCTATCgAgAAgATCAgCCTTCAAgAgAggCTgATCTTCTTTAgCTTTTTTC-3´
pLL GCR sh1	5´-TAAgCTTTCCTggAgCAAATATTTCAAgAgAATATTTgCTCCAggAAAgCTTTTTTTTC-3´
pLL GCR sh2	5´-TCAgACTCAACTTggAggATCATTCAAgAgATgATCCTCCAAgTTGAgTCTgTTTTTTC-3´
pLL GCR sh3	5´-TCTgCATgTACgACCAATgTAATTCAAgAgATTACATTggTCgTACATgCAgTTTTTTC-3´

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle II.9: PCR-Primer von TIB-Molbiol

Gen-Symbol	Gen-Name	Forward Primer 5´→ 3´	Reverse Primer 3´→ 5´	$MgCl_2$ (mM)	Produkt (bp)
ACTB	β-Aktin	*gACAggATgCAgAAggAgATCACT*	*TgATCCACATCTgCTggAAggT*	5	142
CXCL1	Chemokin-Ligand 1	*AgggAATTCACCCCAAgAAC*	*ACTATgggggATgCAggATT*	3	130
CXCR4	Chemokin-Rezeptor 4	*gCATgACggACAAgTACAggCT*	*AAAgTACCAgTTTgCCACggC*	3	101
GCR	Glucocorticoid Rezeptor α	*ATgAACCTggAAgCTCgAAA*	*gATCCTCCAAgTTgAgTCTgg*	5	222
MT2A	Metallo Thionein 2A	*ATggATCCCAACTgCTCCTg*	*TCAggCgCAgCAgCTgCAC*	3	186
pLL	pLentiLox 3.7	*CAgCACAAAAggAAACTCACC*	*CAgCACAAAAggAAACTCACC*	1	239; 289
TNF	Tumornekrose Faktor α	*gTCTCCTACCAgACCAAg*	*CAAAgTAgACCTgCCCAgACTC*	4	205

2.1.6 Chemikalien, Antibiotika, Molekulargewichtstandards und Enzyme

Tabelle II.10: Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
5xSequenzierungspuffer	Applied Biosystems Inc.
5xLoading Buffer	Fermentas GmbH
6xLoading Dye	Fermentas GmbH
10xPCR Puffer	Fermentas GmbH
Accutase	PAA Laboratories GmbH
Acrylamid Mix	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose	Invitrogen GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Annealing Buffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Aprotinin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
ATP	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Big Dye	Applied Biosystems Inc.
Brefeldin A	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Cell Lysis Buffer	Cell Signaling Technology, Inc.
Deferoxamin (DFX)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Dexamethason (wasserlöslich)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Dexamethason-BSA	Steraloids Inc.
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
dNTP Mix	Invitrogen GmbH
Essigsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ethanol	Merck KGaA
Ethidiumbromid	Merck KGaA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Flebogamma®, 50 mg/mL	Grifols Deutschland GmbH
2-Fluoropalmitinsäure	Enzo Life Sciences, Inc.
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
2-Hydroxymyristinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ionomycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Leupeptin	Roche Applied Science
Lipopolysaccharid	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Liposomen	Alexander Scheffold
LSM 1077 (Lymphocyte Separation Medium)	PAA Laboratories GmbH

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
Magermilchpulver	AppliChem GmbH
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Monensin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
***N*,*N*,*N'*,*N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)**	Carl Roth GmbH & Co. KG
N,N-bis(hydroxyethyl)-2aminoethansulfonsäure (BES)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumacetat	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
NP 40 Detergenz	Pierce Protein Research
Phenylmethylsulfonylfluorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Phosphatase Inhibitor	Cell Signaling Technology, Inc.
Phospholipase C (PLC)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Phytohämagglutinin-L (PHA-L)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Polybren	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Propidiumjodid (PJ)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Protease Inhibitor	Cell Signaling Technology, Inc.
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
RNasin® (RNase Inhibitor)	Promega GmbH
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Shrimp alkaline phosphatase (SAP)	Fermentas GmbH
T4 DNA Ligase	Fermentas GmbH
T4 DNA Ligase Puffer	Fermentas GmbH
T4 Polynukleotid Kinase (PNK)	Promega GmbH
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X	Roche Applied Science
Trypanblau (0,04%ige Lsg.)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH
Tunikamycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Tabelle II.11: Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller/Vertrieb
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Gentamycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Penicillin	PAA Laboratories GmbH
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH

Tabelle II.12: Molekulargewichtstandards

Spezifität	Produkt	Hersteller/Vertrieb
DNA	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH
DNA	O'GeneRuler Ladder Mix	Fermentas GmbH
Protein	Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH

Tabelle II.13: Restriktionsenzyme und Puffer

Produkt	Hersteller/Vertrieb
KspA1 (HpaI)	Fermentas GmbH
NotI	Fermentas GmbH
XbaI	Fermentas GmbH
XhoI	Fermentas GmbH
Puffer Tango	Fermentas GmbH
Puffer 0	Fermentas GmbH

2.1.7 Lösungen, Puffer und Kits

Tabelle II.14: Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
6x SDS-Lyse-Puffer	1% (w/v) Bromphenolblau, 35% (v/v) Glycerin, 2,5mL β-Mercaptoethanol, 1,5g SDS, 1M Tris (pH 6,8)
10x SDS Laufpuffer pH 8,3	260mM Tris, 1,9M Glycin, 1% (w/v) SDS
10x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer pH 8,0	0,4M Tris, 0,01M EDTA-Na_2-Salz, 0,2M Essigsäure
10x Transfer-Puffer pH 8,1 – 8,4	250mM Tris, 1,5M Glycin 1-fach Puffer + 10% (v/v) Methanol
BES-Transfektions-Puffer pH 6,95	50mM BES, 0,28M NaCl, 1,5mM Na_2HPO_4
Block-Puffer	TBS-T + 5% (w/v) Magermilchpulver
IP-Lyse-Puffer	10mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM NaCl, 2mM EDTA, 0,1% (v/v) Triton-X100, 1mM PMSF, 2µg/ml Aprotinin, 2µg/ml Leupeptin, 0,1U/µl RNasin
IP-Puffer	0,15M NaCl, 0,05M Tris-HCl (pH 8,0), 1% (v/v) NP 40, Protease Inhibitor, Phosphatase Inhibitor
PBA	PBS/BSA + 0,05% (w/v) NaN_3

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
PBS (Phoshate Buffered Saline) pH 7,6	80mM Na_2HPO_4, 19mM $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 100mM NaCl
PBS/BSA	PBS + 0,5% (w/v) BSA
TBS (Tris Buffered Saline) pH 6,8	150mM NaCl, 10mM Tris-HCl
TBS-T	TBS + 0,1% (v/v) Tween 20

Tabelle II.15: Kits

Kit	Hersteller/Vertrieb
BCA (bicinchoninic acid) Kit	Interchim
Bio-Plex® cell lysis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Plex® Phosphoprotein assay and Bio-Plex® total target assay	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Plex® Phosphoprotein Detection Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH
ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) Kit	Upstate Ltd.
Dual Luciferase Reporter Assay Kit	Promega GmbH
Lightcycler FastStart DNA Master	Roche Applied Science
Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Kit	Pierce Protein Research
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin Extract II®	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin Plasmid II®	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
RNAiFect	QIAGEN GmbH
RNase-freies DNase-Set	QIAGEN GmbH
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN GmbH
Sensiscript RT Kit	QIAGEN GmbH
Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette	Pierce Protein Research
TaqMan® Reverse Transcription Reagents-Kits	Applied Biosystems
Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer

2.1.8 Geräte und sonstige Materialien

Tabelle II.16: Geräte

Gerät	Hersteller/Vertrieb
ABI Prism™ 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems
Bioanalyzer	Agilent Technologies
Biofuge fresco	Heraeus Holding
Bio-Plex® Suspension Array System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Casy® Cell Counter	Schärfe System GmbH
CO_2 Brutschrank	Binder GmbH

Gerät	Hersteller/Vertrieb
ELISA Reader Spectra Max 190	Molecular Devices
FACS Calibur™	BD Bioscience GmbH
FACS Sorter, FACS Diva™	BD Bioscience GmbH
Feinwaage R300S	Santorius Research
Geldokumentationsanlage	Hama GmbH & Co. KG
Glomax Integrated Luciferase Technologies	Promega GmbH
Labofuge 400R	Heraeus Holding
LAS3000	FUJIFILM®
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	Roche Applied Science
LightCycler® II Real-Time PCR System	Roche Applied Science
MACS™ Mix	Miltenyi Biotec
Magnetrührer	IKA Labortechnik GmbH
Mikroskop	Carl-Zeiss-Jena GmbH
Mini-Protean II electrophoresis cell-Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH
MultiScreen vacuum manifold	Millipore GmbH
MX3000pro Real-Time PCR System	Agilent Technologies
ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop
PCR-Cycler Mastercycler Gradient	Eppendorf GmbH
Pipettus®-akku	Hirschmann Laborgeräte
PowerPack 200	Bio-Rad Laboratories GmbH
Rotationsschüttler TH25	Edmund Bühler
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding
Thermomixer Comfort	Eppendorf GmbH
UV-Tisch	Vilber Laurmat
Vortex REAX2000	Heidolph Instruments GmbH
Waage FA-55001	H. Faust GmbH

Tabelle II.17: sonstige Materialien

Materialien	Hersteller/Vertrieb
0,2µm und 0,45µm Sterilfilter	Greiner Bio-One GmbH
0,5; 1,5 und 2ml Reaktionsgefäß	Eppendorf GmbH
10cm Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH
10cm Zellkulturschalen	Greiner Bio-One GmbH
13ml Bakterienkultur-Röhrchen	Sarstedt AG & Co.
15ml PP-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH
175cm² Zellkulturflaschen (T175)	Greiner Bio-One GmbH
5ml FACS-Röhrchen	Sarstedt AG & Co.
0,5; 1,5 und 2ml Reaktionsgefäß	Eppendorf GmbH
5, 10, 20ml Einwegpipetten	Techno Plastic Products AG
50ml PP-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH

Materialien	Hersteller/Vertrieb
6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH
75cm² Zellkulturflaschen (T75)	Greiner Bio-One GmbH
96-Loch MultiScreen Filter Mikrotiterplatte	Millipore GmbH
96-V-Mikrotiterplatte	Biozym Scientific GmbH
BD Vacutainer® (Blutspende-Röhrchen)	BD Biosciences
Einmalspritzen Norm-Ject®	Henke-Sass, Wolf GmbH
Einweghandschuhe	Kimberly-Clark Worldwide, Inc.
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH
MACS® Separation Columns	Miltenyi Biotech GmbH
Neubauer-Zählkammer	VEB Jenoptic
Nitril-Handschuhe	Kimberly-Clark Worldwide, Inc.
Preseparation Filter	Miltenyi Biotech GmbH
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore GmbH

2.1.9 Software

Tabelle II.18: Software

Software	Hersteller/Vertrieb
Adobe® Photoshop® CS Version 8.0	Adobe Systems Inc.
Adobe® Acrobat® Version 7.0	Adobe Systems Inc.
Bio-Plex® Manager Version 4.0	Bio-Rad Laboratories GmbH
Cellquest®	BD Biosciences
Endnote® X1	Thomson Reuters
FlowJo® Versionen 7.2.5 und 7.6.1	Tree Star, Inc.
GENtle Version 1.8.1	Magnus Manske
GraphPad® Prism Version 4.03	GraphPad Software
Image Reader LAS3000	FUJIFILM®
LightCycler Software Version 3	Roche Applied Science
Microsoft® Office Professional 2003 und 2007	Microsoft GmbH
MxPro™ QPCR Software	Agilent Technologies
SOFTmax ProV 5.0	Molecular Devices

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation

In der Molekularbiologie wird das Einbringen von fremder DNA in kompetente Bakterienzellen als Transformation (lateinisch für Umformung) bezeichnet. Nach Zugabe von 5-10ng Plasmid DNA zu 50µl der chemisch kompetenten Bakterien *E. coli* Top10 folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Für maximal 40s wurde ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und der Ansatz unverzüglich auf Eis transferiert. Anschließend folgten die Zugabe von 250µl handwarmen SOC-Mediums und eine Inkubation der Bakterien für 30min bei 37°C auf dem Rotationsschüttler bei 200rpm. Der Transformationsansatz wurde auf eine vorgewärmte LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.2 Bakterienkultur

Eine einzelne Kolonie der transformierten *E. coli* Top10 wurde mit einer sterilen 10µl Pipettenspitze gepickt und in 3ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz gegeben. Für eine Mini-Plasmid-Präparation (NucleoSpin Plasmid II®) folgte eine Inkubation diese Kultur bei 37°C über Nacht auf einem Rotationsschüttler (200rpm). Für eine Midi-Plasmid-Präparation (NucleoBond® Xtra Midi) wurde nach etwa 4-6 stündiger Inkubation 1ml der Vorkultur entnommen und zu 200ml des ampicillinhaltigen LB-Medium gegeben. Die Inkubation der Hauptkultur fand für weitere 12-16h ebenfalls bei 37°C auf einem Rotationsschüttler (200rpm) statt.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Die zellbiologischen Arbeiten, sowohl mit Zelllinien oder primären humanen Immunzellen als auch die Herstellung der für diese Arbeiten notwendigen Medien und Lösungen, wurden unter sterilen Bedingungen (Reinraumwerkbank mit laminarer Luftströmung) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen fand in einem CO_2-Brutschrank unter kontrollierten Bedingungen (37°C, 5% CO_2, 21% O_2 und 95% Luftfeuchtigkeit) statt.

2.2.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeiterhaltung von Zelllinien wurden je eine Million Zellen pro 1ml Einfriermedium (FKS + 10% DMSO) in speziellen Kryo-Röhrchen aufgenommen und für 24h in einem Einfrierkontainer (gefüllt mit Isopropanol) bei -80°C vorgekühlt. Nach Ablauf der 24h

konnten die Aliquote in den flüssigen Stickstoff (ca. -196°C) überführt werden. Dieses schrittweise Vorgehen und die Verwendung von DMSO verhindern eine Kristallbildung innerhalb der Zellen.
Zum Auftauen der Zellen wurde ein Aliquot aus dem Stickstoff entnommen und auf Eis gehalten. Nach dem Auftauen wurden die Zellen unmittelbar mit 1ml des entsprechenden vorgewärmten Mediums versetzt und schrittweise in eine T75 Zellkulturflasche mit 20ml Medium überführt.

2.2.2.2 Kultivierung von adhärenten Zellen

Bei HEK 293T (Human Embryonic Kidney) Zellen handelt es sich um eine adhärent wachsende Zelllinie, welche durch Transformation einer menschlichen Nierenzelle mit viralen DNA-Sequenzen des Adenovirus 5 und des SV40 Virus hergestellt wurde. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 20ml (75cm^2) oder 50ml (175cm^2) Gewebekulturflaschen mit Filter in DMEM-Medium (siehe 2.1.2). Zum Passagieren adhärenter Zellen mussten diese von der Oberfläche gelöst werden. Dafür wurde das Medium entfernt und nach einem Waschschritt 1ml Trypsin/EDTA gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Trypsin ist ein proteolytisch aktives Enzym, welches Arginin und Lysin spaltet. EDTA ist ein Komplexbildner, welcher besonders stabile Chelatkomplexe mit zwei- und dreiwertigen Kationen bildet, die meist zur Stabilisierung von Membranproteinen dienen. Nach etwa 10min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von serumhaltigem Medium abgestoppt, da Trypsin/EDTA bei höheren Dosen oder bei längerer Inkubation eine toxische Wirkung auf die Zellen hat. Nach Zentrifugation der Zellen bei 328*g für 8min wurde das Pellet in DMEM resuspendiert und etwa 1/3 bis 1/5 der Zellen in einer neuen Gewebekulturflasche inkubiert.

2.2.2.3 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Jurkat T-Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut eines 14 Jahre alten Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie gewonnen. Diese Zelllinie wurde in 20ml (75cm^2) oder 50ml (175cm^2) Zellkulturflaschen in RPMI 1640 Medium (siehe 2.1.2) kultiviert und zum Passagieren bei 328*g für 8min in einem entsprechenden PP-Röhrchen abzentrifugiert. Das verbrauchte Medium wurde verworfen, das Pellet in frischen RPMI 1640 resuspendiert und etwa 1/5 bis 1/10 der Zellen in eine neue Zellkulturflasche gegeben.

2.2.2.4 Isolation mononukleärer Zellen aus humanem peripherem Blut (PBMCs)

Zur Anreicherung von PBMCs wurden Buffy Coats vom DRK Berlin-Wannsee geordert oder frisches Blut von freiwilligen Spendern (mit Zustimmung der Ethikkommission der Charité zu diesem Projekt) in mit Lithium-Heparin beschichtete Blutspende-Röhrchen entnommen. Zur Isolierung von mononukleären Zellen wurde die Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Paque (LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium), einem Polysaccharid aus

Saccharose und Epichlorhydrin, genutzt. Dafür wurde das Blut, welches im Verhältnis von etwa 1:2 mit eiskaltem PBS/BSA vorverdünnt wurde, vorsichtig auf das vorgelegte Ficoll-Paque (etwa 12,5ml in 50ml PP-Röhrchen) aufgeschichtet. Die Zentrifugation fand bei 836*g für 20min bei Raumtemperatur mit ausgeschalteter Bremse statt. Aufgrund ihrer hohen Dichte gelangen rote Blutkörperchen und polymorphkernige Leukozyten (Granulozyten) durch das Ficoll-Paque hindurch, während sich Lymphozyten und Monozyten bedingt durch ihre geringere Dichte im Vergleich zu Ficoll-Paque in einer Interphase oberhalb der Ficoll-Paque-Schicht anreichern. Diese Zwischenschicht wird entnommen und mit etwa 40ml PBS/PBA bei 328*g für 8min bei 4°C gewaschen.

2.2.2.5 Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) primärer CD14+ oder CD4+ Zellen

Die Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) basiert auf der Isolation der verschiedenen Zellpopulationen aufgrund der Expression unterschiedlicher spezifischer Oberflächenmoleküle. Dafür wurden sogenannte MicroBeads™ (an superparamagnetische Partikel mit einer Größe von etwa 50nm gekoppelte, spezifische monoklonale Antikörper) verwendet. Um zuvor unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, wurden die isolierten PBMCs in 800µl PBS/BSA mit Zusatz von 10% (v/v) Flebogamma resuspendiert und für 10min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von 200µl Anti-CD14/CD4-MicroBeads™ und eine Inkubation für 15min bei RT. Der Ansatz wurde mit 20ml kaltem PBS/BSA gewaschen und bei 328*g für 8min bei 4°C abzentrifugiert, um die nicht gebundenen MicroBeads™ zu entfernen. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 2ml PBS/BSA resuspendiert. Die Positivsortierung erfolgte manuell nach Herstellerangaben (Miltenyi Biotec GmbH, siehe Abb.II.1). Die isolierten Zellen wurden gezählt und mittels Durchflusszytometrie auf Reinheit und Vitalität untersucht.

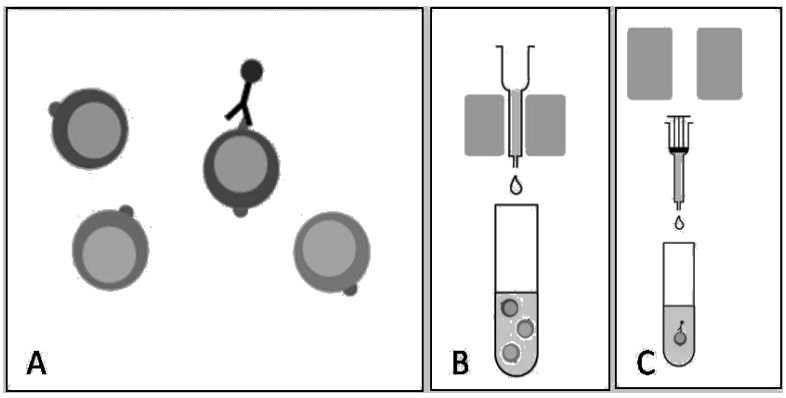

Abbildung II.1: Magnetisch aktivierte Zellsortierung. Die MACS Zellsortierung basiert auf zellspezifischen monoklonalen Antikörpern welche an 50nm kleinen, superparamagnetischen Partikeln konjugiert sind, den MACS MicroBeads™. Mit den MicroBeads™ markierte Zellen (A) werden in einem magnetischen Feld in einer MACS Trennsäule platziert und fixiert (B) und bei Entfernen des magnetischen Feldes wieder freigegeben (C) (nach *miltenyibiotec.com*).

2.2.2.6 Zellzahlbestimmung

2.2.2.6.1 Neubauer-Zählkammer

Um die Zellzahl zu bestimmen wurden 10µl einer Zellsuspension mit 10µl Trypanblau-Lösung versetzt. Diese Substanz wird von abgestorbenen Zellen aufgenommen und färbt diese dunkelblau an. Bei lebenden Zellen hingegen kann dieser anionische Diazofarbstoff nicht durch die intakte Membran dringen. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 10µl des Gemisches in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop die Zahl nicht gefärbter Zellen in den 4 Großquadraten bestimmt. Die Zellzahl pro Milliliter ergibt sich mittels folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{(Zellzahl} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammerfaktor)}}{\text{Zahl der ausgezählten Großquadrate}}$$

2.2.2.6.2 Casy Zellzählsystem

In 10ml PBA wurden 10µl einer Zellsuspension gemischt und die Konzentration an lebenden Zellen mittels Casy® Cell Counter bestimmt. Dabei wird mittels leichtem elektrischen Feld die Unversehrtheit der Zellmembran ermittelt und aufgrund der Größe zwischen vitalen und abgestorbenen Zellen unterschieden.

2.2.2.7 Transfektions- und Transduktionsmethoden

2.2.2.7.1 Transiente Transfektion zur Suppression der Genexpression mittels RNA-Interferenz (RNAi)

Bei RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen Mechanismus eukaryotischer Zellen, die Expression eines bestimmten Zielgenes durch eine siRNA (small interfering RNA) zu unterbinden. Dies stellt einen Schutzmechanismus des Immunsystems gegen fremde RNA von z.B. Viren dar. Für das Einbringen des siRNA Duplex in die HEK 293T Zellen wurde das RNAiFect Transfektionsreagenz (QIAGEN GmbH) verwendet. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C wurde mit Hilfe der RNeasy-Methode (QIAGEN GmbH) die cytosolische RNA der transfizierten Zellen isoliert und als Template für eine Real-Time-PCR Reaktion eingesetzt.

2.2.2.7.2 Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK 293T Zellen für Reportergenassay zum Nachweis der Reinheit und Stabilität von Dex-BSA via Luciferase-Reportergenassay

Diese einfache und kostengünstige Methode beruht auf dem Prinzip, dass kristallines Calciumphosphat, welches aus Calciumchlorid und Natriumphosphat entstandenen ist, Komplexe mit der zu übertragenden DNA bildet. Nach Ausfallen der Kristalle wird die DNA

durch Endozytose in die Zellen aufgenommen.
Um eine optimale Transfektionseffizienz zu erzielen, wurden die zu transfizierenden Zellen am Vortag in einer Konzentration von $5*10^5$/2,5ml in 6-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Am folgenden Tag wurden 2µg des pGRE-Luc Vektors, 0,5µg des pRL Vektors und 1µg des pMax-GFP Vektors auf 200µl mit destilliertem Wasser in einem FACS-Röhrchen eingestellt. Als Kontrollen der Firefly-Luciferaseaktivität dienten der pGL3-Basic Vektor (besitzt keine Promotor- und Enhancer-Sequenz) als Negativkontrolle und der pGL3-Control-Vektor (besitzt eine SV40 Promotor- und Enhancer-Sequenz) als Positivkontrolle, welche parallel transfiziert wurden. Nach Zugabe von 50µl 1,25M Calciumchlorid wurde unter Lufteinstrom 250µl BES Puffer tröpfchenweise in die Lösung gegeben. Um die Kristallisation zu unterstützen, wurde der Ansatz 20min erschütterungsfrei stehen gelassen. Die Zellen wurden im Anschluss mit dem entstandenen Präzipitat tropfenweise versetzt. Nach 4-6h wurde das Kulturmedium erneuert und überschüssiges Präzipitat entfernt. Nach 48h Inkubation konnte die Transfektionseffizienz mittels FACS Calibur (GFP Expression) bestimmt und der Luciferase-Reportergenassay durchgeführt werden.

2.2.2.7.3 Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK 293T Zellen zur Herstellung von Virenpartikeln

Hierfür wurden einen Tag vor der Transfektion $6*10^6$ HEK 293T Zellen pro 10cm-Zellkulturschale ausgesät. Eine Gesamtmenge von 30µg in einem Verhältnis (3:2:1) der zu transfizierenden Plasmide (shRNA-Expressions-Plasmid: Verpackungs-Plasmid: Envelope-Plasmid) wurden in einem FACS-Röhrchen mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 800µl eingestellt und mit 200µl 1,25M Calciumchlorid versetzt. Unter Lufteinstrom wurde 1ml BES Puffer tröpfchenweise in die Lösung gegeben. Um die Kristallisation zu unterstützen, ruhte der Ansatz für 20min erschütterungsfrei. Die Zellen wurden im Anschluss mit dem entstandenen Präzipitat tropfenweise versetzt. Nach 4-6h wurde das Kulturmedium erneuert und überschüssiges Präzipitat entfernt. Die Zellen wurden 48-72h inkubiert, bevor die Virenpartikel, nach Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels FACS Calibur (GFP Expression), entnommen wurden. Zur Beseitigung von Zellen und Zelltrümmern wurde der Virusüberstand filtriert (0,45µm Sterilfilter), aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.7.4 Transduktion von HEK 293T Zellen

Das durch Calcium-Phosphat-Transfektion entstandene lentivirale Expressionssystem besteht aus folgenden 3 Plasmiden:

I) Das Expressionsplasmid pLentiLox (pLL3.7) enthält das zu verpackende Material mit dem eigentlichen Transgen, welches eine Expressionskassette mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) sowie eine shRNA-Expressionskassette enthält. Zusätzlich beinhaltet es die Verpackungsinformation, welche dafür sorgt, dass die neu produzierten Viruspartikel mit RNA gefüllt werden. Aus Sicherheitsgründen wurden bei der Entwicklung des Systems

sowohl cis-wirkende Elemente, als auch Gene, die nicht für die Transduktion notwendig sind, entfernt, sodass die entstehenden Viren zwar infektionsfähig, aber replikationsunfähig sind.

II) Das Envelope-Plasmid (pCI-VSVG) beinhaltet die Information über das Hüllprotein, das das Wirtsspektrum bestimmt.

III) Das Verpackungsplasmid (psPAX2) liefert die Information für alle essentiellen viralen Bausteine, die für den korrekten Virusaufbau notwendig sind.

HEK 293T Zellen wurden viral infiziert, indem die entsprechenden Virenüberstände, versetzt mit 10µg/ml Polybren (Sigma-Aldrich), bei 700*g und 32°C für 120min auf die Zellen zentrifugiert wurden. Nach weiteren 4h Inkubation bei 37°C wurde der virenhaltige Überstand entfernt und durch herkömmliches DMEM Medium ersetzt. Nach 72-96h wurden die shRNA-Konstrukt tragenden Zellen über die Co-Expression des GFP mittels FACS Diva durchflusszytometrisch sortiert, bis eine Anreicherung von wenigstens 90% GFP positiver Zellen erzielt wurde. Kurz vor der Durchführung der Experimente wurde eine durchflusszytometrische Kontrolle der GFP Expression am FACS Calibur durchgeführt, um sicherzustellen, dass das shRNA-Konstrukt nicht einen Selektionsnachteil darstellt, welcher für eine prozentuale Zunahme der GFP negativen Fraktion sorgen würde.

2.2.2.8 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Hierbei handelt es sich um eine Form der Durchflusszytometrie, bei der Zellen, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, analysiert und sortiert werden können. Die Zellsuspension wird durch eine Kapillare gesaugt und die (mittels hydrodynamischer Fokussierung) vereinzelten Zellen passieren einen Laserstrahl. Die Zellen streuen dabei das Licht, wobei die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität korreliert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideward Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts, welche von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur des Zellkerns sowie der Menge der enthaltenen Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes recht gut unterscheiden. Die auf diese Weise entstandenen Daten wurden mit FlowJo®-Software ausgewertet.

2.2.2.9 Hochsensitive Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis mGCR positiver Zellen

Zum Nachweis des mGCR-Proteins wurde der monoklonale Antikörper antiGCR 5E4 [166] verwendet. Dazu wurden die Zellen (je Ansatz $1*10^6$ HEK 293T; HeLa, Jurkat oder CD14+ Monozyten) für 10min mit dem antiGCR-Dig-Konjugat inkubiert. Um die Spezifität der Färbung bewerten zu können, wurde jeweils ein Aliquot der Zellen für 10min mit unmarkiertem antiGCR in 50-100fachem Überschuss vorbehandelt und ein anderes Aliquot wurde ohne antiGCR-Dig inkubiert. Nach Zugabe und Inkubation mit der anti-Dig/anti-Biotin

Matrix und mehreren Waschschritten wurden für die hochsensitive Immunfluoreszenz-Analyse carboxyfluoresceinhaltige magnetofluoreszente Liposomen als indirektes Sekundärfärbereagenz verwendet [88]. Um tote Zellen von der Analyse auszuschließen, wurde Propidiumjodid direkt vor der durchflusszytometrischen Messung zugegeben. Die Auswertung der mittels FACS Calibur und CellQuest-Software ermittelten Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo®.

2.2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.2.3.1 RNA- und DNA-Analysen

2.2.3.1.1 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Plasmid-DNA-Gewinnung in einem großen Maßstab wurden transformierte *E. coli* Bakterien in 5ml LB Flüssigmedium, versetzt mit Antibiotikum (z.B. 100µg/ml Ampicillin) vorkultiviert. Nach ca. 7h wurden 200µl dieser Vorkultur auf 200ml LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben, die Zellen für 16h expandiert und anschließend bei 6000*g für 10min pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde die Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet mittels NucleoBond® Xtra Midi-Kit (Macherey-Nagel) entsprechend der Herstellerangaben isoliert und in destilliertem Wasser eluiert. Um die Plasmide von Endotoxinen zu befreien wurden sogenannte NucleoBond® Finalizer (Macherey-Nagel) entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde am ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) ermittelt.

2.2.3.1.2 Isolation von Total-RNA

Die RNA-Isolation erfolgte mittels RNeasy® Mini Kit (QIAGEN GmbH) entsprechend der jeweiligen Herstellerangaben inklusive optionaler DNA-Restriktion mittels RNase-freier DNase I (QIAGEN GmbH). Die Konzentration der Total-RNA wurde am ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) ermittelt. Total-RNA, welche für die Genexpressionsanalyse mittels Microarray genutzt wurde, wurde mittels LabChip® Technologie auf dem Bioanalyzer (Agilent Technologies) hinsichtlich der rRNA Ratio [28S / 18S], als Maß für die RNA Qualität, analysiert. Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben an der DRFZ Core Facilty Geneexpression. Total-RNA mit einer rRNA Ratio [28S / 18S] im Bereich von 1,5-2,2 wurde für die nachfolgenden Experimente verwendet (Abb. II.2).

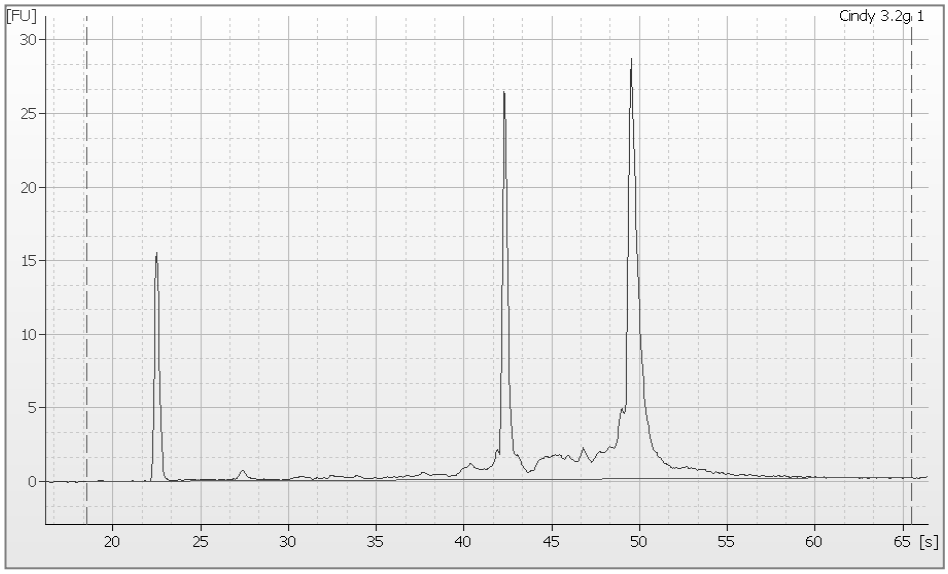

Abbildung II.2: Repräsentative Darstellung einer Bioanalyzer Analyse einer Probe Total RNA. Die Qualitätsbestimmung einer Total RNA Probe anhand der rRNA Ratio [28S / 18S]. In der Kurvendarstellung sind ganz rechts der Peak der 28S und in der Mitte der Peak der 18S Untereinheit abgebildet. Die Fläche unter der Kurve ist ein Maß für die RNA Menge.

2.2.3.1.3 Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentrationen werden die Absorptionseigenschaften der aromatischen Ringsysteme der Basen von Nukleinsäuren mit einem Absorptionsmaximum bei 260nm genutzt. Nach dem Lambert-Beer´schen Gesetz, welches die Grundlage der Photometrie bildet, ist die Absorption proportional zur Konzentration. Die Messungen wurden am ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) durchgeführt, wobei 1,3µl der Proben unverdünnt auf die Messzelle aufgetragen wurden.

2.2.3.1.4 Klonierung der verschiedenen pLL3.7 GCR sh Vektoren

I) Restriktion, Dephosphorylierung und Aufreinigung des pLL3.7 Vektors

Um DNA-Fragmente mit hoher Effizienz in einen Vektor zu klonieren, muss der Vektor an einer definierten Stelle innerhalb einer meist palindromischen Konsensussequenz geschnitten werden. Dabei wird die Bindung zwischen Phosphatgruppe und Desoxyribose im Zuckerphosphatrückgrat beider DNA-Stränge hydrolysiert. Die Spaltung kann entweder symmetrisch unter Bildung von glatten Enden oder versetzt unter Bildung 3´- oder 5´-überhängender Enden erfolgen. Der pLL3.7 Vektor wurden mit den Restriktionsendonukleasen KspAI und XhoI nach Angaben des Herstellers im Tango Puffer 1h bei 37°C mit 10–20U je Enzym im Gesamtvolumen von 30µl geschnitten. (PCR-Produkte wurden über Nacht mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben geschnitten.)
Um eine Religation des Vektors ohne Insertion zu verhindern, wurde die Plasmid-DNA nach der Restriktion mit alkalischer Phosphatase behandelt. Diese entfernt die terminalen 5´-Phosphatgruppen der linearen Plasmid-DNA und unterbindet dadurch die Rezirkularisierung der Plasmid-DNA. Dafür wurde dem Restriktionsansatz 1µl der alkalischen Calf Intestinal Phosphatase (CIP) hinzugegeben und 1h bei 37°C inkubiert.

Zur Kontrolle und Aufreinigung der linearisierten Plasmid-DNA wurde die Probe auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Das entsprechende Fragment mit korrekter Größe wurde unter UV-Licht ausgewählt, mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten und mittels NucleoSpin Extract II® – Kit von Macherey-Nagel nach den Herstellerangaben aufgereinigt.

II) Annealing und Phosphorylierung der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden in destilliertem Wasser in einer Konzentration von 100µM (nach Herstellerangaben) gelöst. Um doppelsträngige Moleküle zu erzeugen, wurden die komplementären Oligonukleotide mit Annealingpuffer in einem Thermocycler inkubiert. Das Annealing-Programm beinhaltete einen 5minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C und langsames Abkühlen mit einer Rampengeschwindigkeit von 0,03K/s auf 4°C.
Um dieses Insert erfolgreich in den geschnittenen Vektor einzuklonieren, war eine Phosphorylierung des Inserts an der 5'-Hydroxylgruppe notwendig. Die Phosphorylierung mithilfe einer T4 Polynukleotidkinase (PNK) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

III) Ligation und Nachweis positiver Klone mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung

Der linearisierte Vektor und das Insert wurden im Anschluss ligiert. Dafür wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, welche mit Hilfe des Cofaktors ATP die Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5´- Phosphatgruppe an einem DNA-Ende mit der 3´- OH-Gruppe an dem anderen DNA-Ende schließen kann. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14°C nach Angaben des Herstellers. Von diesem Ansatz wurde eine Transformation (siehe 2.2.1.1) in *E.coli* Top10 durchgeführt. Es wurden mehrere Klone mit 10µl-Pipettenspitzen von der entsprechenden LB-Platte gepickt und die Pipettenspitze in ein Eppendorfgefäß mit vorgelegtem 10µl destilliertem Wasser platziert. Diese Lösung diente bei einer Kolonie-PCR als DNA Template, wobei das zu erwartende PCR-Produkt 289bp (korrekte Insertion) bzw. 239bp (ohne Insert) umfassen sollte. Der PCR-Ansatz und das PCR–Programm sind in den Tabellen II.19 und II.20 aufgelistet.

Tabelle II.19: PCR Ansatz für die Kolonie-PCR

Substanz	**Menge [µl]**
destilliertes Wasser	10
10xPCR Puffer	2
$MgCl_2$ (25mM)	1
dNTPs (25µM jeder)	0,2
Taq Polymerase (Rapidozym)	0,5
Primer pll.for	2
Primer pll.rev	2
Template	2,3

Tabelle II.20: PCR Programm für die Kolonie-PCR

Temperatur °C	Zeit	Wiederholungen
95	3min	
95	20s	40
60	15s	
72	30s	
72	10min	
4	Pause	

Die abschließende Sequenzierung zum Nachweis einer fehlerfreien Insertion erfolgte nach der leicht abgewandelten Sanger-Methode, dem *Cyclesequencing* (mit der Anwendung thermostabiler DNA-Polymerasen). Dabei wurde der bekannte pLL3.7 forward Primer als Sequenzierungsprimer verwendet. Außer den üblichen dNTPs wurden auch die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide hinzugemischt (jede Sorte mit einem unterschiedlichen Farbstoff), so dass beim Einbau eines solchen Nukleotids die Reaktion abgebrochen wird, da die 3'OH-Gruppe des zu synthetisierenden Stranges nicht mehr für den nächsten Schritt zur Verfügung steht. Letztendlich entsteht somit ein Gemisch von verschieden markierten DNA-Fragmenten unterschiedlicher Längen. Der Standard Sequenzierungs-PCR-Ansatz und das verwendete Programm sind in den Tabellen II.21 und II.22 aufgelistet.

Tabelle II.21: PCR Ansatz für die Sequenzierungs-PCR

Substanz	Menge [µl]
destilliertes Wasser	4,5
5xSequenzierungspuffer	2
Big Dye	1
Primer (3-5pmol)	0,5
Template (200-300ng)	2

Tabelle II.22: PCR Programm für die Sequenzierungs-PCR

Temperatur °C	Zeit	Wiederholungen
96	10s	35
45	5s	
60	4min	
4	Pause	

Die dadurch erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Ethanolfällung nach Standardprotokoll aufgereinigt und das erhaltene Gemisch mittels Elektrophorese aufgetrennt. Das Fluoreszenzsignal wurde über einen optischen Aufbau gekoppelt und das Spektrum in die Farbstoffanteile zerlegt. Die Auswertung und die Übersetzung in die Nukleotidsequenz erfolgten mittels GENtle-Software.

2.2.3.1.5 cDNA-Synthese

Nach Isolation der RNA mittels RNeasy® Mini Kit (QIAGEN GmbH) erfolgte die cDNA-Synthese mittels TaqMan® Reverse Transcription Reagents-Kit (Applied Biosystems) nach Standardprotokoll, wobei eine RNA Menge zwischen 200 und 400ng pro Reaktion eingesetzt wurde.

2.2.3.1.6 Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR

Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wobei die Quantifizierung anhand von Fluoreszenz-Messungen (SYBR Green, Roche Applied Science) durchgeführt wird, die in Echtzeit („Real-Time“) während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz wird nach Interkalation des Farbstoffes in die DNA emittiert und nimmt somit proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Anhand der Fluoreszenzsignale wird die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, da nur während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen (Abb. II.3).

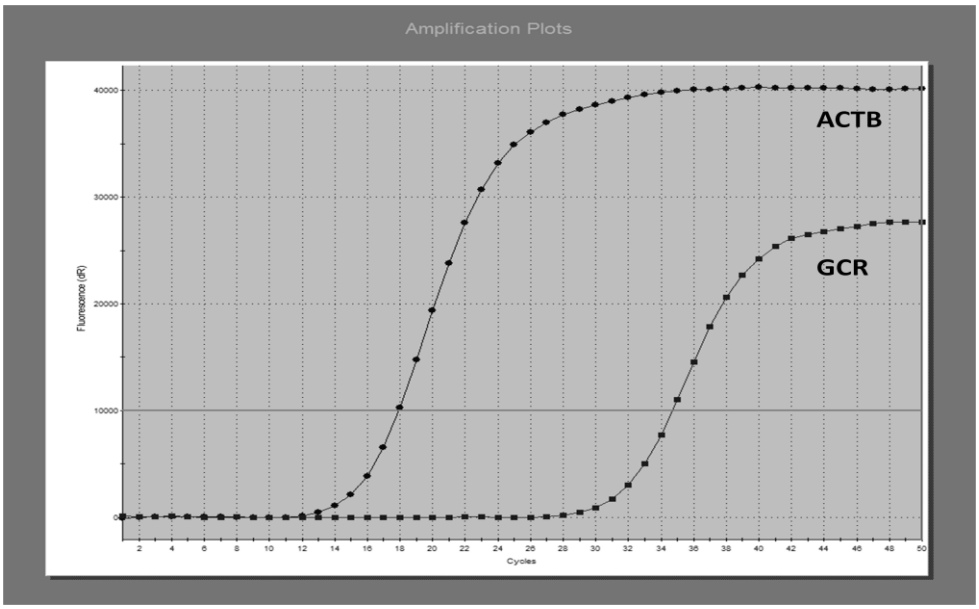

Abbildung II.3: Amplifikationskurve einer Real-Time-PCR. Proportionale Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Menge an entstandenem PCR-Produkt (ACTB; GCR) Anhand dieser Fluoreszenzintensität wurde die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen.

Um innerhalb der exponentiellen Phase zu messen, wurde der C_T-Wert (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus") verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Um zwischen verschiedenen PCR-Produkten zu unterscheiden, wurde zur Gewährleistung der Spezifität eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wobei das Fragment bei seiner spezifischen Schmelztemperatur denaturiert und den Fluoreszenzfarbstoff freisetzt (Abb. II.4).

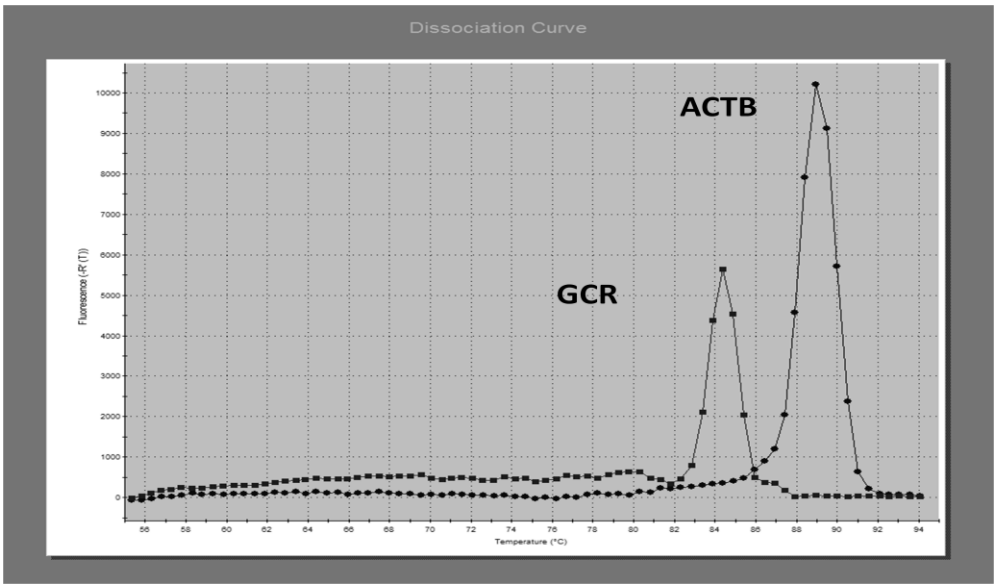

Abbildung II.4: Ableitung der Schmelzkurve einer Real-Time-PCR. Durch Denaturierung der PCR-Produkte wurde der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) freigesetzt. Unterschiedliche PCR Produkte ließen sich anhand ihrer unterschiedlichen spezifischen Schmelztemperatur unterscheiden.

Als interne Kontrolle (Referenzgen) diente in dieser Arbeit das Transkript von β-Aktin (ACTB), dessen Signal verwendet wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA/cDNA auszugleichen. Die mit dem Referenzgen normalisierten PCR-Amplifikatmengen (Zielgene) ($\Delta C_T = C_{T\ Zielgene} - C_{T\ ACTB}$) jeder untersuchten Probe wurden ins Verhältnis gesetzt, wobei die Effizienz (E) definiert ist als:

$$E = 10^{-1/m}$$

Die Steigung der Kurve wird von m dargestellt, wobei 100% Steigung eine Verdopplung der cDNA Matrize pro Zyklus entspricht, was im Idealfall also einer Effizienz von 2 entsprechen würde. Ausgehend vom Idealfall, dass die Effizienz der PCR der Zielgene sowie der Referenz identisch gleich 2 ist gilt also:

ΔC_T ohne Effizienzkorrektur:

$$\text{relative Expression}_{\text{Zielgen/ACTB}} = 2^{-(CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{ACTB}})}$$

Bei der $\Delta\Delta C_T$ Methode wird die unterschiedliche Expression der beiden Gruppen (z.B. Knockdown/Kontrolle) als n-fache Expression angegeben:

$\Delta\Delta C_T$:

$$\text{normalisierte relative Expression}_{(\text{knockdown/ACTB})} = 2^{(CT_{\text{Zielgen Kontrolle}} - CT_{\text{Zielgen knockdown}} + CT_{\text{ACTB Kontrolle}} - CT_{\text{ACTB knockdown}})}$$

In dieser Arbeit wurden zwei Systeme verwendet, LightCycler Kapillaren (Roche Applied Science) oder 96-V-Mikrotiterplatten (Biozym, Scientific GmbH). Bei beiden Systemen wurde zuerst jeweils 5µl des Mastermixes (Lightcycler FastStart DNA Master, Roche Applied Science) und anschließend 5µl einer 1:10 verdünnten cDNA-Probe eingebracht. Je nach untersuchtem Gen wurden vorher die geeigneten $MgCl_2$-Konzentrationen ermittelt und das laut Gerät entsprechende Programm verwendet.

2.2.3.1.7 Genexpressionsanalyse mittels Microarray

Um Effekte von an BSA gekoppeltem Dexamethason auf das Genexpressionsprofil primärer humaner Monozyten zu analysieren, wurde eine Transkriptomanalyse mittels DNA *Microarray* durchgeführt. Hierzu wurden die aus der Leukozytenphase einer Blutkonserve (nach Aufbereitung durch das DRK) isolierten CD14+ Monozyten für 24h mit LPS (2µg/ml) stimuliert um die mGCR Expressionsfrequenz zu erhöhen. Anschließend wurden die Zellen mit der entsprechenden Substanz (Dex 10^{-8}M; BSA^{-9}M; Dex-BSA^{-9}M) für 20min stimuliert. Der Anteil an Dex im Dex-BSA ist 10x geringer im Vergleich zu reinem Dex, da pro BSA Molekül durchschnittlich 10 Dexamethason-Moleküle gebunden sind. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen für weitere 3h inkubiert, um eine Änderung des Genexpressionsprofils zu ermöglichen. Als Kontrollen dienten zum einen unstimulierte Monozyten und zum anderen mit LPS stimulierte Monozyten. Um eine Vorauswahl der verwendeten Spender zu treffen, wurde ein TNFα ELISA der gewonnenen Überstände durchgeführt, wodurch zwei der insgesamt 7 Spenderproben vorher eliminiert wurden (siehe 2.2.3.2.4).

Die verbleibenden Proben wurden gepoolt und entweder in Cyanin-3-Cytidin-5‘-Triphosphat (Cy3-) oder Cyanin-5-Cytidin-5‘-Triphosphat (Cy5) -markierte cDNA umgeschrieben und auf dem *Human Whole Genome Microarray* (44k) (Agilent Technologies) entsprechend der Herstellerangaben hybridisiert. Die Auslesung der Hybridisierungsmuster erfolgte über einen Perkin-Elmer Fluoreszenzfarbstoff-Scanner für Cy3/Cy5-Einzel- oder Doppelmarkierungen. Die aufgenommenen Signale wurden mit der Software Image Analysis Tool (Vers. A 6.1.1) mit den Grundeinstellungen aufbereitet. Die primäre Datenanalyse erfolgte mittels Rosetta Informatics Platform Resolver Built 4.0 Software. Die Durchführung erfolgte an der DRFZ Core Facilty Geneexpression (Miriam Tschirschmann, Luzie Reiners-Schramm, Agnes Schumacher) und an der MPI Core Facility Geneexpression (Miriam Tschirschmann, Hans Mollenkopf).

Die detaillierte Auswertung der Daten fand mittels Microsoft Access und Excel statt. Da alle Proben für 24h mit LPS vorinkubiert wurden, konnten für alle Ansätze eine Ratio (Stimulans X vs. LPS) gebildet und die obere Grenze bei >1,5 (d.h. 1,5 fache Steigerung der Genexpression) und die untere Grenze bei <0,75 (d.h. 0,25 fache Abnahme der Genexpression) gesetzt werden. Dadurch wurden die Gene identifiziert, deren Regulation durch LPS Stimulation ausgelöst werden kann. Diese, durch LPS regulierten Gene wurden von den folgenden Analysen ausgeschlossen und dadurch die durch die jeweiligen Substanzen beeinflussten Gene herausgefiltert. Im Anschluss wurden die unterschiedlich stimulierten Proben miteinander unter den gleichen Gesichtspunkten verglichen, um die verbleibenden Gene für Dex-BSA herauszufiltern, welche den extrazellulär ausgelösten Nettoeffekt des an BSA gebundenen Dexamethason darstellen (Abb. II.5).

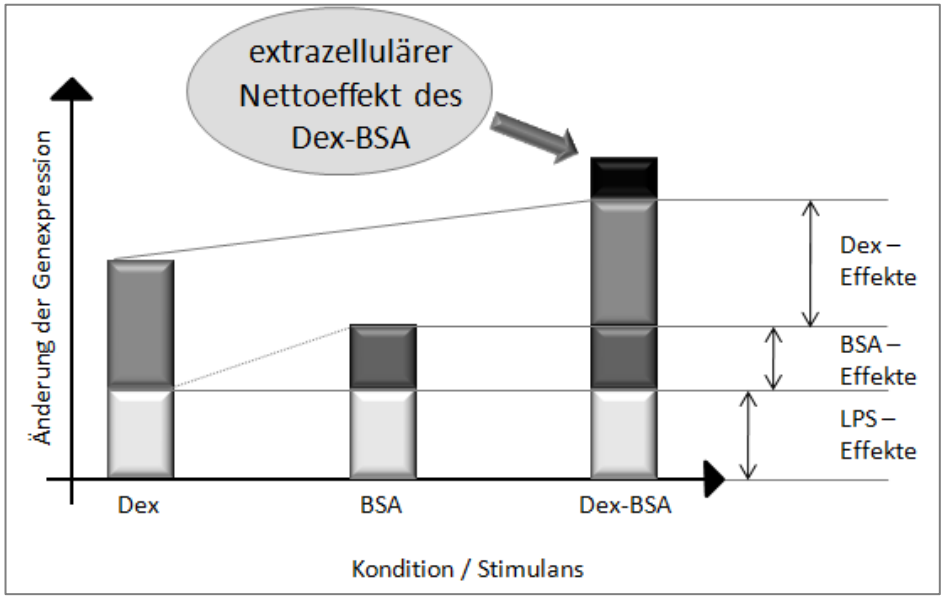

Abbildung II.5: Ermittlung der Dex-BSA Nettoeffekte. Die extrazellulären Effekte nach Inkubation mit Dex-BSA wurden durch Bildung der Ratio (z.B. Stimulans X vs. Stimulans Y) ermittelt. Alle Konditionen wurden mit LPS vorinkubiert, was eine Eliminierung dieser Effekte ermöglichte. Auch wurden BSA oder Dex Einzeleffekte ermittelt, welche bei der Dex-BSA Kondition ausgeschlossen wurden.

Eine funktionelle Klassifizierung der Gene erfolgte über die NCBI EntrezGeneID Nomenklatur und wurde mittels Panther Klassifizierungssystem (**P**rotein **AN**alysis **TH**rough **E**volutionary **R**elationships http://www.pantherdb.org) durchgeführt. Somit wurden die Gene den biologischen Stoffwechselwegen zugeordnet, die sie beeinflussen.

2.2.3.2 Proteinanalysen

2.2.3.2.1 Proteinisolation nach Zelllyse – Gesamtzellextrakt

Für die Gewinnung von Gesamtzellextrakt wurden im Anschluss an die Kultivierung 0,5-1*10^6 Zellen je nach Zelltyp (primäre humane Monozyten: 1*10^6 Zellen, HeLa/ HEK 293T Zellen: 0,5*10^6 Zellen) für die Proteinisolation verwendet. Die Zellen wurden 8min bei 328*g und 4°C abzentrifugiert und in 20µl 1x SDS-Lyse-Puffer lysiert. Bis zur Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Gesamtzelllysate bei -20°C aufbewahrt. Zellen, welche für den Luciferase-Reportergenassay verwendet wurden, wurden in 50µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega GmbH) lysiert und ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.2.2 Proteinisolation für eine Immunpräzipitation

Für eine Immunpräzipitation wurden 1*10^7- 4*10^7 Zellen je nach Zelltyp (primäre humane Monozyten: 4*10^7 Zellen, HEK 293T Zellen: 1*10^7 Zellen) in 300µl IP Lyse Puffer/1*10^7 Zellen aufgenommen, auf Eis inkubiert und 12µl 3M NaCl/300µl IP Lyse Puffer zugegeben. Nach erneuter Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13000*g für 15min bei 4°C entfernt. Anschließend wurde sofort mit der Immunpräzipitation begonnen.

2.2.3.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA Verfahren

Bei dem BCA (Bicinchoninic acid) Proteinbestimmungs-Assay handelt es sich um ein Verfahren, das sich durch hohe Empfindlichkeit und geringe Störanfälligkeit auszeichnet. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+}-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden, die sogenannte Biuret-Reaktion. Die Cu^{2+}-Ionen dieses Komplexes werden zu Cu^{+}-Ionen reduziert, die mit Bicinchinon-Säure einen violetten Farbkomplex bilden (Abb. II.6). Die Absorption dieses Farbkomplexes wird bei 562nm gemessen.

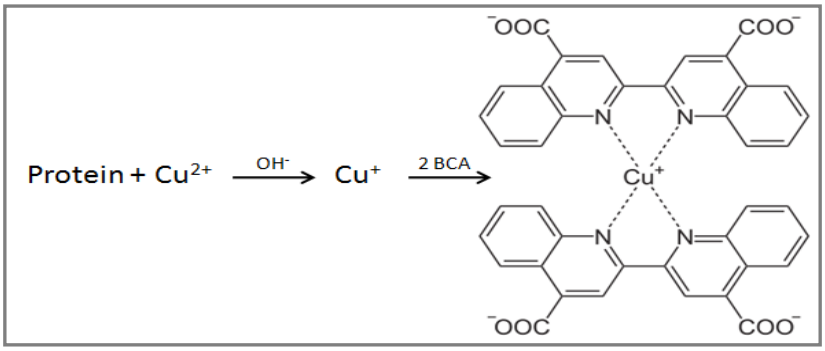

Abbildung II.6: Proteingehaltsbestimmung mittels BCA Verfahren. Proteine bilden mit Cu^{2+}-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex, welche zu Cu^{+}-Ionen reduziert werden, die mit Bicinchinon-Säure einen violetten Farbkomplex bilden.

Zu jeder Messung wurden fünf BSA-Standards in einer Standardkonzentrations-verdünnungsreihe mitgeführt. Gesamtzelllysate wurden 1:10 vorverdünnt eingesetzt. Der Reaktionsansatz betrug 25µl Standard bzw. Proteinlösung + 200µl der frisch angesetzten BCA-Reaktionslösung in 96-Loch-Platten. Die Platten wurden für 30min bei 37°C inkubiert und am ELISA Reader analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software SoftMax pro V5 (Molecular Devices).

2.2.3.2.4 TNF-alpha ELISA

Es ist bekannt, dass die TNFα Sekretion durch LPS Stimulation ansteigt, wobei Dexamethason diesen Effekt aufhebt. Von humanen CD14+ Monozyten aus buffy coats, welche bei der *Microarray* Analyse Anwendung finden sollten, wurden die Zellkulturüberstände nach der Stimulation abgenommen und mittels humanTNFα ELISA (Invitrogen GmbH) nach Standardprotokoll analysiert (Prinzip Abb. II.7), um im Voraus die vom bekannten Schema abweichenden Spender auszuschließen.

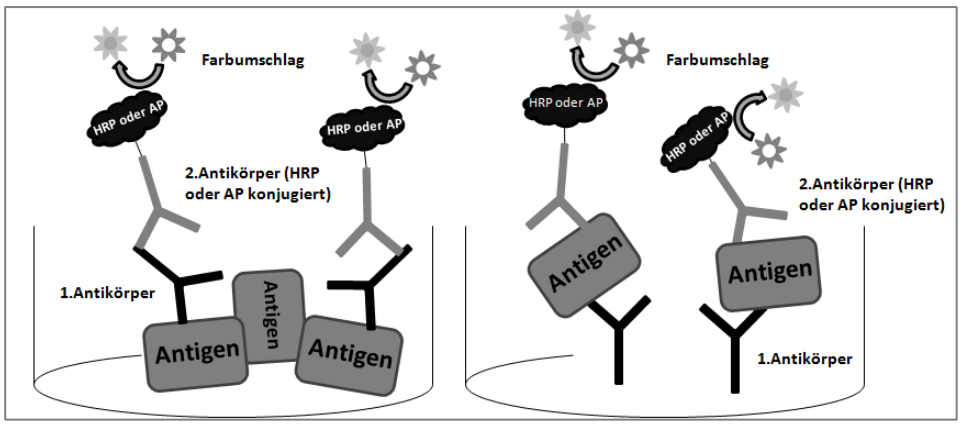

Abbildung II.7: Prinzip ELISA. Beim indirekten ELISA (links) wird das zu detektierende Antigen an die Oberfläche gebunden, während beim Sandwich ELISA (rechts) der 1. Antikörper an die Oberfläche gebunden ist und das in der Probe nachzuweisende Antigen „fängt". Ungebundene Bestandteile der Probe werden entfernt und ein sekundärer Antikörper - konjugiert an Meerrettichperoxidase (HRP) oder Alkalische Phosphatase (AP) - bindet ebenfalls an das Antigen. Nach Entfernen des überschüssigen Antikörper-Enzym-Komplexes erfolgt die Inkubation mit dem passenden Substrat (Chromogen), wodurch eine Farb-, Fluoreszenz- oder Chemoluminiszenzreaktion erzeugt wird, welche sich proportional zu der Konzentration des Antigens in der Probe verhält und somit eine quantitative Aussage über das Antigen ermöglicht.

Insgesamt wurden Monozyten von 7 Spendern verwendet und mittels TNFα ELISA analysiert. Die Absorption wurde gegen eine definierte Standardkurve in einem Platten-ELISA-Reader (Spectra Max 190, Molecular Devices) bestimmt und via SoftMax pro V5 (Molecular Devices) ausgewertet.

2.2.3.2.5 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE erfolgt die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht, unabhängig von ihrer Eigenladung und Molekülstruktur. Von den Gesamtzelllysaten wurde eine BCA Proteinbestimmung durchgeführt und durchschnittlich 10µg Gesamtprotein entnommen, für 10min bei 95°C inkubiert und auf das SDS-Gel aufgetragen. Dabei werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken (durch SDS) und der Schwefelbrücken zwischen den Aminosäuren Cystein (durch β-Mercaptoethanol) aufgelöst. SDS dient des Weiteren auch zur Überdeckung der Eigenladung der Proteine, da dieses Detergenz stark negativ geladen ist. Nach Anreicherung der Proteine im Sammelgel wurden diese im elektrischen Feld in einem 10%igen Trenngel (Tab. II.23) aufgetrennt. Mit Hilfe eines mitgeführten Standards ließen sich die Molekulargewichte ermitteln.

Tabelle II.23: Zusammensetzung der Gele nach Sambrock

Reagenz	Trenngel (10%)	Sammelgel (12%)
H_2O	1,9ml	2.1ml
30% Acrylamid Mix	1,7ml	0,5ml
1,5M Tris (pH8,8)	1,3ml	0,38ml
10% SDS	0,05ml	0,03ml
10% APS	0,05ml	0,03ml
TEMED	0,003ml	0,003ml

2.2.3.2.6 Analyse aufgetrennter Proteine mittels Western Blot

Beim Western Blot erfolgte die Übertragung der aufgetrennten, negativ geladenen Proteine auf eine PVDF (Polyvinyldifluorid)-Trägermembran mittels elektrochemischen Transfers im Tank-Blot-System (Abb. II.8).

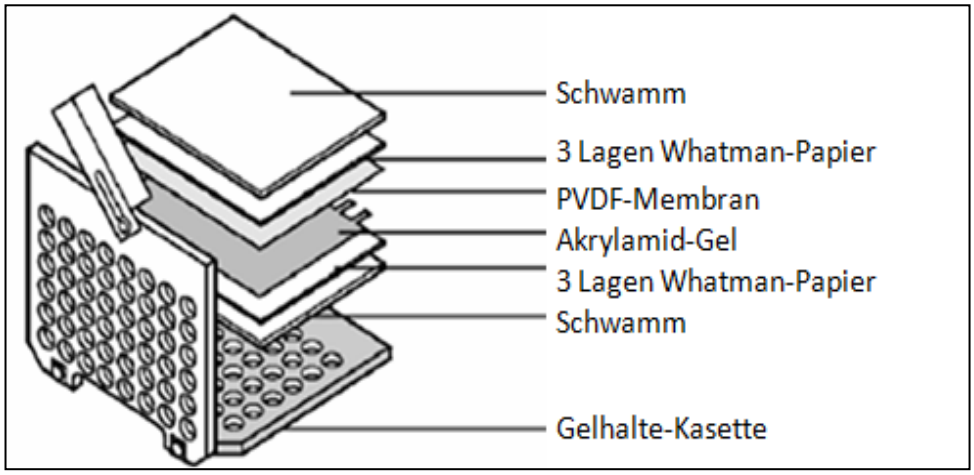

Abbildung II.8: Aufbau einer Blotting -Apparatur im Tank-Blot-System. In der mit Blotting-Puffer und Kühlaggregaten gefüllten Kammer erfolgte der Transfer der Proteine über Nacht unter ständigem Rühren bei 4°C und einer angelegten Spannung von 40V (Quelle BioRad-Manual).

2.2.3.2.7 Nachweis der durch Western Blot übertragenen Proteine mittels Chemilumineszenz

Mittels spezifischer Antikörper konnten die Proteine, welche auf die PVDF- Trägermembran übertragen wurden, identifiziert werden. Unspezifische Bindungen wurden durch Block-Puffer zu Beginn unterbunden und unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch mehrere Waschschritte wieder entfernt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper in TBS-T erfolgte in adäquater Konzentration für 1,5h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-IgG-HRP: 1:10.000; anti-Kaninchen-IgG-HRP: 1:10.000), welcher mit der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase:* HRP) konjugiert war, in TBS-T für 1h bei RT. Die HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der Licht der Wellenlänge von 428nm emittiert wird und somit das Protein über Lichtemission nachgewiesen werden kann. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 5ml TBS-T erfolgte die Detektion mit 1ml Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin

Elmer). Die Lichtemission wurde von einem FUJIFILM® LAS3000 Kamerasystem digital aufgezeichnet.

2.2.3.2.8 Isolation und Aufreinigung membrangebundener Proteine mittels Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Kit und Slide-A-Lyzer® Dialyse Cassette

Zur Isolation membrangebundener Proteine wurde das Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Kit (Pierce Protein Research) benutzt, welches eine selektive Anreicherung von kleinen Mengen an hydrophoben membranassoziierten oder -gebundenen Proteinen auf einfache Art ermöglicht. Zu Beginn der Prozedur wurden die Zellen in Reagenz A lysiert und durch Zugabe einer zweiten Lösung mit Detergenz (Reagenz B + Reagenz C) die hydrophoben Membranproteine in Lösung gebracht. Nach Zentrifugation zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wurde der Mix bei 37°C für 20min inkubiert um eine Phasentrennung zu ermöglichen. Die untere Phase enthielt die hydrophoben Proteine, während sich die hydrophilen Bestandteile in der oberen Phase befanden. Zur Aufreinigung der so gewonnenen Membranfraktion wurde eine Dialyse durchgeführt, bei welcher niedermolekulare Stoffe (wie z.B. Salze) aus der Protein-Lösung entfernt wurden. Eine einfache, schnelle Variante stellten die Slide-A-Lyzer Dialyse Cassetten (3,5K; 0,5 - 3ml; Thermo Scientific) dar. Mittels Spritze wurde die Membranfraktion in die Cassette eingefüllt und nach Dialyse ohne Verlust an Probe entnommen. Abschließend wurden eine SDS-PAGE und Western Blot Analyse der Fraktionen durchgeführt.

2.2.3.2.9 Immunpräzipitation zur Anreicherung von Proteinen

Um Proteine, welche nur in geringer Menge in einer Zelle vorkommen anzureichern, wurde eine Immunpräzipitation (IP) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, bei der mittels eines Antikörpers ein Antigen aus einer Lösung aufkonzentriert wird (Abb. II.9).

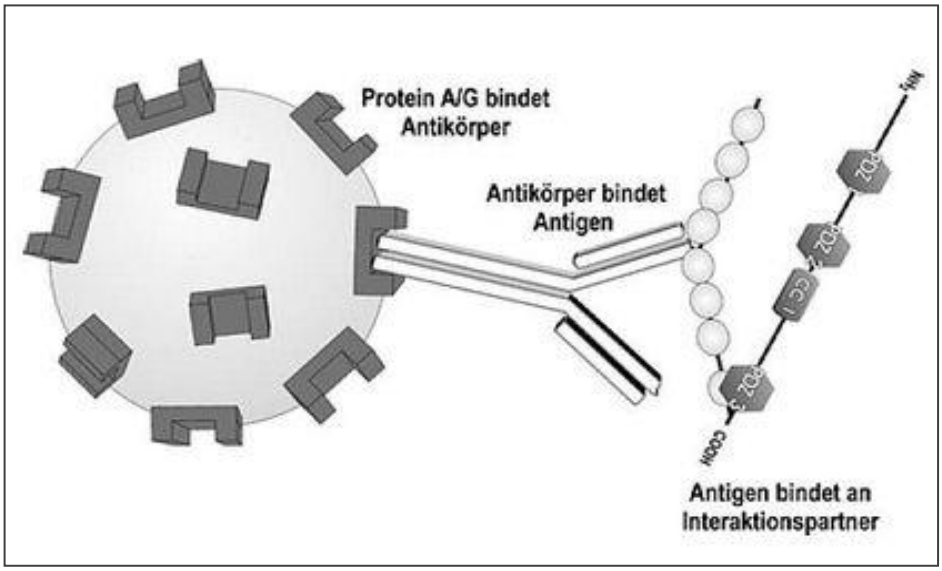

Abbildung II.9: Schema einer Immunpräzipitation. Das Proteingemisch wird mit dem spezifischen Antikörper inkubiert. Durch Zugabe von Protein A/G Sepharose kann der Antigen/Antikörper Komplex präzipitiert werden. Quelle: www.wikipedia.org

I) Etablierung einer cGCR IP

Um die geeigneten Bedingungen für die IP zu finden, wurde diese zuerst für den cytosolischen Glucocorticoidrezeptor etabliert: Nach Lyse (Lyse Puffer; ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) Kit; Upstate Ltd. oder IP-Lyse-Puffer siehe 2.1.7) von $1*10^7$ HEK 293T Zellen bzw. $4*10^7$ CD14+ Monozyten, wurde der spezifische GCR-Antikörper (Klon 5E4) in unterschiedlicher Konzentration zum Lysat gegeben und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Ansatz mit der Protein A Agarose für 1h bei 4°C unter Rotation belassen. Protein A bindet mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Antikörper. Das Protein A ist an die Agarose gekoppelt um eine Präzipitation, in diesem Fall mittels Zentrifugation, zu ermöglichen. Nach mehreren Waschschritten (mit oder ohne Salzreihe) wurde das Pellet mit SDS-Lyse-Puffer versetzt und aufgekocht. Die Probe wurde auf ein denaturierendes Proteingel aufgetragen und anschließend mittels Western Blot nachgewiesen.

II) Etablierung einer mGCR IP

Hierfür wurde folgendes Vorgehen verfolgt, um die Präzipitation des mGCR unter Vermeidung einer Kontamination durch den cytosolischen Rezeptor zu ermöglichen:
Intakte Zellen ($1*10^7$ HEK 293T Zellen bzw. $4*10^7$ CD14+ Monozyten) wurden mit dem spezifischen anti-GCR-Antikörper (Klon 5E4) [166] über Nacht bei 4°C und ständiger Rotation inkubiert. Durch mehrere Waschschritte mit PBS wurde überschüssiger Antikörper von den Zellen entfernt und durch Zugabe des spezifischen synthetischen Antigens (*APTEK26* GenScript Corporation) freie Antigenbindungsstellen blockiert. Erst jetzt wurden die Zellen auf milde Weise durch Hypotonie lysiert, um ein Lösen der Antigen-Antikörper-Bindung zu vermeiden. Wie bei der cGCR IP folgte die Zugabe und Inkubation mit der Protein A Agarose,

mehrere Waschschritte zur Aufreinigung der Präzipitate und der Nachweis nach Denaturierung mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse.

2.2.3.2.10 Luciferase-Reportergenassay

Zur Gewährleistung der Stabilität und Reinheit von Dex-BSA und zur Kontrolle der Funktionalität eines GCR-Knockdowns wurde ein Luciferase-Reportergenassay durchgeführt. Dafür wurden HeLa bzw. transduzierte HEK 293T Zellen mit dem pGRE-Luc Vektor (Clontech Laboraties, Inc.) transfiziert und mit Dexamethason bzw. Dex-BSA inkubiert.
Der pGRE-Luc Vektor beinhaltet ein Glucocorticoid Response Element (GRE) und eine *Firefly* Luciferase. Nach Bindung eines Transkriptionsfaktors, hier also des Dexamethason/ Glucocorticoidrezeptor Komplexes, an das GRE wird die Transkription induziert und die *Firefly* Luciferase exprimiert. Als interne Kontrolle und zur Normalisierung auf die Transfektionseffizienz wurde das pRL Plasmid cotransfiziert. Dieses codiert eine *Renilla* Luciferase, welche konstitutiv exprimiert wird. Zusätzlich wurden zwei Kontrollen, eine Positivkontrolle, durch Transfektion von pGL3con, und eine Basiskontrolle, durch Transfektion von pGL3bas, mitgeführt.
Transfizierte Zellen wurden für 15min mit 10^{-8}M Dexamethason bzw. 10^{-9}M Dex-BSA inkubiert, das Medium durch frisches DMEM ersetzt und die Zellen für weitere 3h belassen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (8min bei 328*g und 4°C), das Pellet in 50µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega) aufgenommen und bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt. Die Luciferaseaktivität wurde mittels Dual Luciferase-Reportergenassay Kit und dem GloMax® 96 Luminometer (beides Promega) bestimmt.

2.2.3.2.11 Analyse kinomischer Effekte mittels PepChip™ Kinase Array

Um schnelle Effekte, wie Phosphorylierungsprozesse während der Signaltransduktion nachzuweisen, wurde ein Peptid-Microarray (PepChip™) durchgeführt. Es wurden je Kondition 2,4 Mio. CD14+ Monozyten von 5 freiwilligen Spendern eingesetzt. Die Frequenz mGCR positiver Monozyten wurde durch eine 24 stündige LPS Behandlung (2µg/ml) erhöht. Für die Versuche wurde eine Dexamethason-Konzentration von 10^{-8}M und entsprechend eine Dexamethason-BSA-Konzentration von 10^{-9}M gewählt, da pro BSA Molekül durchschnittlich 10 Dexamethason-Moleküle gebunden sind. Nach Entfernen der mit LPS versetzten Medien und einer anschließenden 20 minütigen Inkubation mit den Substanzen bzw. frischem Medium (Kontrolle) wurden die Zellen in Cell lysis buffer (Cell Signaling Technology), welcher mit Halt Phosphatase Inhibitor und Halt Protease Inhibitor (beides Cell Signaling Technology) versetzt war, lysiert und bei -80°C eingefroren. In Zusammenarbeit mit der niederländischen Arbeitsgruppe um Dr. Mark Löwenberg wurde die Analyse der Proben mittels PepChip™ Kinase Verfahren durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Zelllysate mit radioaktivem $^{33-}$P-ATP markiert und auf den Kinase-Array gegeben. Dieser beinhaltet 1024 Peptid-Kinase-Substrate verschiedener Spezies in Triplikaten. Nach 48 stündiger Inkubation des PepChip™ Kinase-Arrays mit einem Speicherphoshorschirm (*storage*

phosphor screen) konnten die Ergebnisse eingescannt und ausgewertet werden (Details zum technischen Vorgehen sind unter http://www.pepscan.nl publiziert). Die Spotintensitäten wurden mit dem Programm ScanAlyze (http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm) bestimmt und die Hintergrundstrahlung subtrahiert. Sowohl die normierten Werte für Dex als auch für Dex-BSA wurden gegen die Kontrolle verglichen und eine statistische Analyse (two tailed t test; type one) durchgeführt.

2.2.3.2.12 Analyse kinomischer Effekte mittels Bio-Plex® Phosphoprotein Assay

Das Verfahren zur Bestimmung von durch Kinasen vermittelten Proteinphosphorylierungen basiert auf der Multiplex-Technologie und erlaubt den gleichzeitigen Nachweis von mehreren phosphorylierten Proteinen in einer einzelnen Probe. Derzeit sind Assays für 35 unterschiedliche Phosphoproteine erhältlich. Bei diesem Verfahren wird der Gesamtgehalt an phosphoryliertem Protein (*Total-Target*) und in einem getrennten Ansatz die Menge eines spezifischen Phosphoproteins bestimmt. Das Prinzip ist in Abb. II.10 dargestellt.

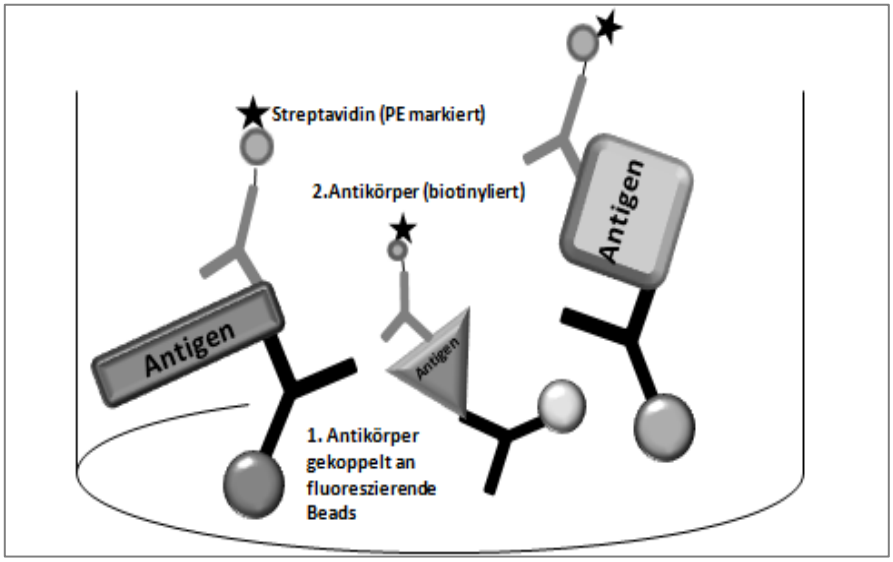

Abbildung II.10: Prinzip Phosphoprotein Bio-Plex® Beim Phosphoprotein Bio-Plex® werden Mikrosphären (mikroskopisch kleine Beads), welche unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe beinhalten (je nach Zielantigen), mit dem zu detektierendem Antigen über Nacht inkubiert. Ein zweiter Antikörper, markiert mit Biotin, wird zugegeben und für 30min mit dem Gemisch belassen. Abschließend wird PE-Streptavidin zugegeben und die 96well Platte im Bio-Plex® Suspension array system gemessen. Durch unterschiedliche Bead Regionen lässt sich ein spezifisches Antigen nachweisen, wobei die Fluoreszenzintensität eine Aussage zur Menge an Protein gibt.

Wie in 2.2.3.2.10 beschrieben, wurde auch hier die Frequenz mGCR positiver Monozyten (je $4*10^6$ Zellen/Kondition) durch eine 24 stündige LPS Stimulation (2µg/ml) erhöht. Für die Versuche wurde ebenfalls eine Dexamethason-Konzentration von 10^{-8}M und entsprechend eine Dexamethason-BSA-Konzentration von 10^{-9}M gewählt. Nach Entfernen der mit LPS versetzten Medien und einer anschließenden 20 minütigen Inkubation mit den Substanzen bzw. frischem Medium zur Kontrolle wurden die Zellen in Lyse Puffer (Bio-Plex® cell lysis kit, Bio-Rad) aufgenommen und sonifiziert (pulse 5x). Durch Zentrifugation (4500*g, 20min, 4°C) wurden Zelltrümmer entfernt und der Überstand abgenommen. Von einem Teil des Lysates wurde eine BCA Proteinbestimmung durchgeführt und das restliche Lysat nach Zugabe von Assay Puffer (Bio-Plex® phosphoprotein detection reagent kit, Bio-Rad) im Verhältnis 1:1 bei -80°C eingefroren. Die Lysate wurden mit einer 1:1 Mischung aus Lyse Puffer und Assay

Puffer auf eine Endkonzentration von 0,8µg/µl eingestellt. Die Durchführung des Nachweisverfahrens erfolgte gemäß Herstellerangaben (Bio-Rad):

- Inkubation der Proben mit den mit Fluoreszenzfarbstoff gefüllten Mikrosphären (Beads)
- Inkubation der Antigen-Primärantikörper-Beadkomplexe mit dem biotinylierten Sekundärantikörper
- Inkubation der Biotin-Sekundärantikörper-Antigen-Primärantikörper-Beadkomplexe mit dem Streptavidin-PE

Zwischen den Schritten wurden die Proben mehrmals mit Waschpuffer gewaschen, mit je 125µl Resuspensionspuffer versetzt und die Proben noch einmal kurz aufgeschüttelt. Die Messung erfolgte in einem Luminex 100 System (auch Bio-Plex®; Bio-Rad). Die Daten wurden mit der Bio-Plex® Manager 4.0 Software erhoben und analysiert. Für jede Probe wurden Duplikate gemessen. Als Positivkontrolle dienten Bio-Plex® Assay Lysate (EGF behandelte HEK 293 für Akt, ERK1/2; ERK2, TNFα behandelte HeLa für IκB-α und UV behandelte HEK 293 p38 MAPK).

Ergebnisse

3. Ergebnisse

Einige Glucocorticoideffekte treten zu schnell nach Gabe der Medikamente auf, als dass sie durch Veränderungen auf genomischer Ebene, also durch transkriptionelle Effekte, hervorgerufen werden könnten. Die genauen Mechanismen dieser nicht genomischen Effekte sind bisher noch unklar. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass membrangebundene Glucocorticoidrezeptoren (mGCR) einen Teil der nicht-genomischen Wirkungen vermitteln. Die Existenz dieser Rezeptoren wurde bereits mit Hilfe der hochsensitiven Immunfluoreszenz auf humanen Monozyten und B-Zellen von gesunden Probanden nachgewiesen. Vorangegangene Arbeiten haben auch gezeigt, dass eine inflammatorische Stimulation der Zellen mit Lipopolysacchariden den Anteil von mGCR-positiven Monozyten deutlich erhöht, was durch Brefeldin A (einen Inhibitor des „sekretorischen pathways“) verhindert werden kann. Eine Überexpression des humanen αGCR führte jedoch nicht zu einer gesteigerten mGCR-Expression [87]. Diese *in vitro* Befunde sind in Übereinstimmung mit klinischen Beobachtungen, wonach Patienten mit Rheumatoider Arthritis, einer chronisch entzündlichen Erkrankung, eine erhöhte Frequenz an mGCR-positiven Monozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufweisen und dieser Umstand positiv mit der Krankheitsaktivität korreliert.

3.1 Vorkommen des mGCR und dessen Expressionsfrequenz unter Einfluss verschiedener Stimuli

Die Experimente zur Untersuchung der Herkunft der mGCR wurden bevorzugt an Zelllinien durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Dazu wurden in ersten Analysen unterschiedliche Zelllinien auf die Expression des mGCR mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung hin überprüft. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer maximalen Verstärkung der Fluoreszenzsignale um bis Faktor 1000 im Vergleich zu konventionellen Färbetechniken, durch die Anwendung von carboxyfluoresceinhaltigen (Cy5) Liposomen als indirektes Sekundärfärbereagenz (siehe Abschnitt 2.2.8.1).
Es wurden insgesamt je Ansatz $1*10^6$ HEK 293T, HeLa oder Jurkat Zellen gefärbt. Neben dieser Färbung wurde parallel eine Kontrolle mitgeführt, welche nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurde. In einem weiteren Kontrollansatz wurden die mGCR mit ungekoppeltem antiGCR Antikörper blockiert. Letztendlich erhält man pro Kondition also zusätzlich eine Kontrolle und den sogenannten Block, welche bei Analyse der Daten von den ermittelten Werten der Färbung abgezogen wurden (Abb. III.1).

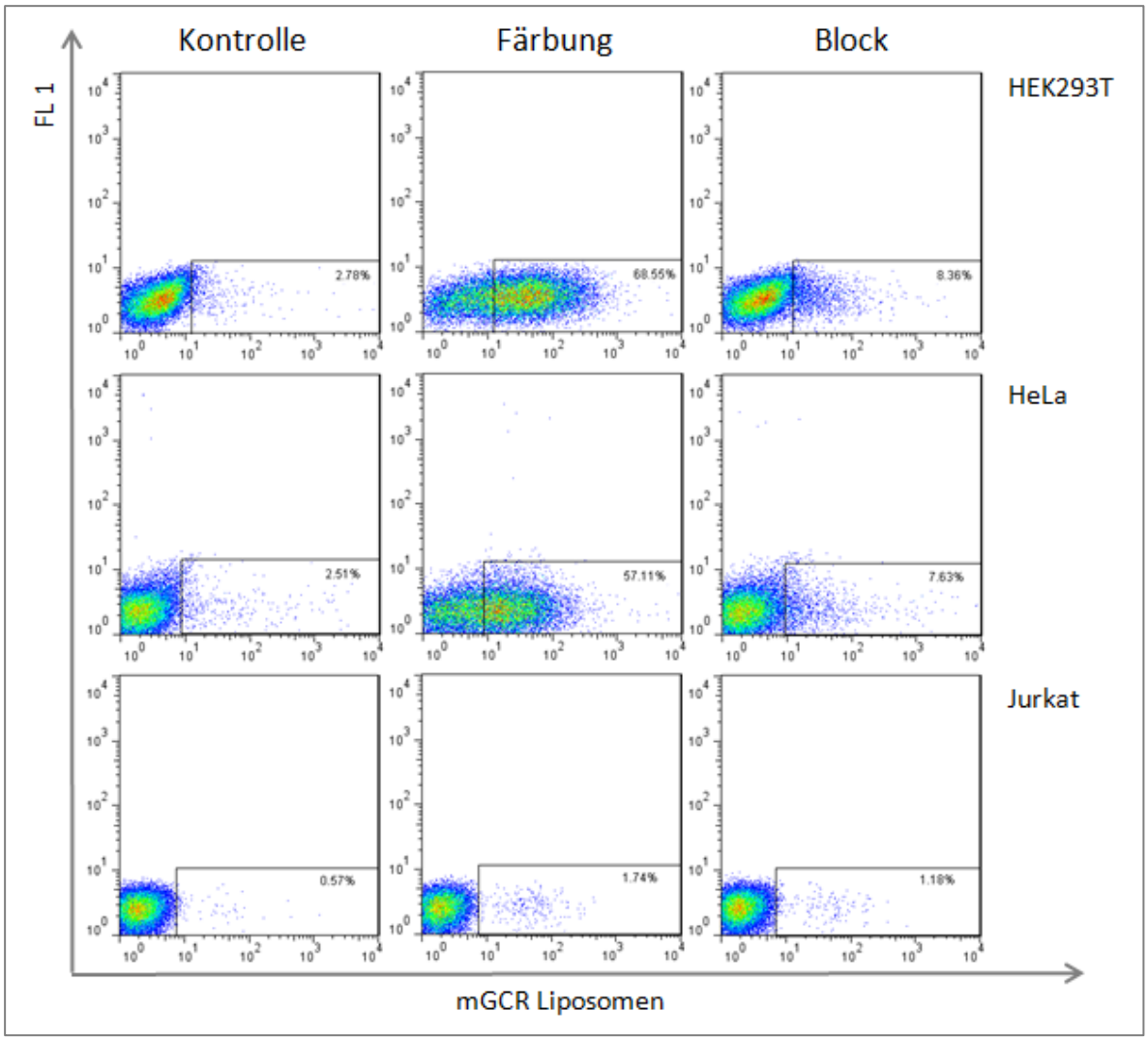

Abbildung III.1: Auswahl der geeigneten Zelllinie mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung des mGCRs. Unterschiedliche Zelllinien wurden auf die mGCR Expressionsfrequenz hin untersucht. Neben den Färbungen (mittlere Spalte) mittels antiGCR-Dig Antikörper wurde eine ungefärbte Kontrolle (linke Spalte) und ein Block (rechte Spalte) mittels ungekoppelten Antikörpers mitgeführt.

Die beiden adhärent wachsenden Zelllinien HEK 293T und HeLa weisen eine hohe mGCR Expressionsfrequenz auf. Im Gegensatz dazu exprimieren die Jurkat Zellen, eine humane T-Zelllinie von einem Leukämiepatienten, keine mGCR auf der Zelloberfläche. Sowohl die HEK 293T als auch die HeLa Zelllinie eignen sich daher zur Analyse des mGCR. In den folgenden Experimenten wurden HEK 293T Zellen verwendet, welche einen sehr hohen prozentualen Anteil der Gesamtpopulation (meist zwischen 60 und 70%) als mGCR exprimierend aufweisen.

Erste Untersuchungen betrafen die mGCR Expressionsfrequenz in den Zellen in Abhängigkeit von bestimmten Einflüssen wie z.B. der Konfluenz, also der Dichte der Zellen in der Kulturflasche, um spätere Verfälschungen der Ergebnisse durch Nichtbeachten dieser Bedingungen zu vermeiden (Abb. III.2A).

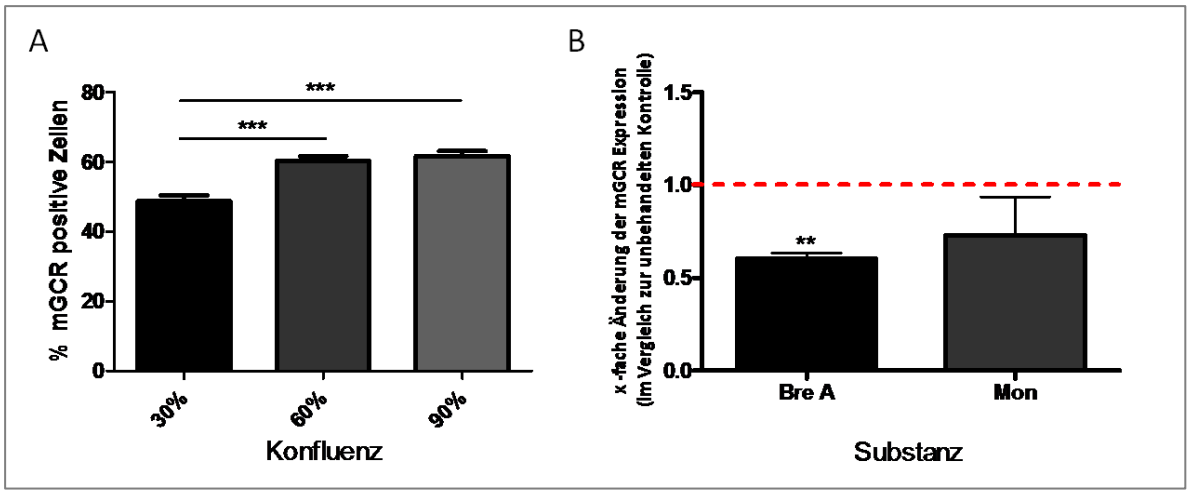

Abbildung III.2: Effekte verschiedener Einflüsse auf die mGCR Expression in humanen HEK 293T Zellen. Zusammenfassung von insgesamt 7 Experimenten zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Konfluenz und mGCR Expressionsfrequenz. Die Konfluenz in den verwendeten Zellkulturflaschen wurde dabei im ersten Versuch per Auge eingeschätzt und die Zahl der ausgesäten Zellen für Folgeversuche übernommen (A). Durch Inhibition des Transportes wurde der mGCR im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle verringert auf der Oberfläche exprimiert (B). (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-sample t-test: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.005$). Bre A – Brefeldin A; Mon - Monensin

Die höchste mGCR Expression (n=7; 62% mGCR positive Zellen; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-sample t-test: *** $p < 0.001$) lässt sich bei HEK 293T Zellen bei etwa 90% Konfluenz ermitteln (Abb.III.2A), d.h. die Zellkulturflasche ist bis auf kleinere Lücken komplett mit Zellen bewachsen. Sind größere Lücken auf dem Flaschenboden vorhanden, ist also ein Zell-Zell Kontakt nicht erkennbar (entspricht etwa 30% Konfluenz), sinkt auch die mGCR Expressionsfrequenz signifikant (n=7; 49% mGCR positive Zellen; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-sample t-test: *** $p < 0.001$). Dies wurde bei allen weiteren mGCR Bestimmungen beachtet.

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Transport des membranständigen Rezeptors auch bei HEK 293T Zellen gehemmt werden kann, was schon für Monozyten mittels Brefeldin A gezeigt wurde [87, 167]. Die Anwendung des Transportinhibitors Brefeldin A (Hemmung des Transportes vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat und somit der Proteinsekretion) zeigte eine deutliche Reduktion der mGCR Expression (n=3; Reduktion der mGCR Expression um 40%; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-sample t-test: *** $p < 0.01$) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (Abb.III.2B). Die mGCR Expressionsfrequenz konnte ebenfalls durch einen Inhibitor des intrazellulären Proteintransportes, dem Monensin, im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle gehemmt werden (n=3; Reduktion der mGCR Expression um 30%; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-sample t-test: n.s.) (Abb.III.2B).

Auch wurden einige typische posttranslationale Modifikationen (Palmitoylierung, Myristoylierung und Glykosylierung) gehemmt. Des Weiteren wurden Proteine, welche über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)- Anker in der Membran fixiert sind, mit Hilfe der Phospholipase C entlassen und Effekte hinsichtlich der mGCR Expression analysiert (Abb. III.3).

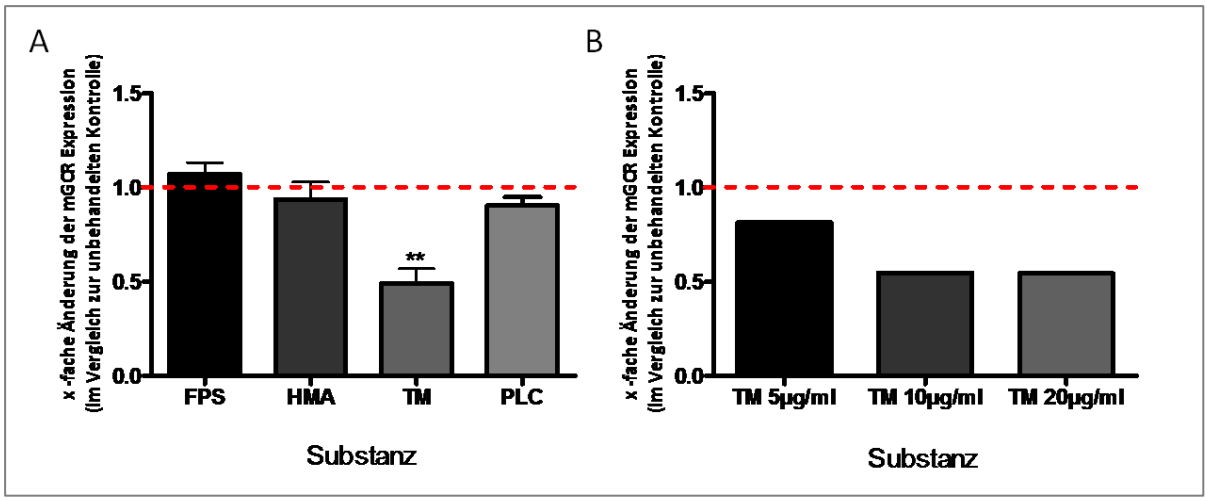

Abbildung III.3: Effekte einiger Inhibitoren auf die mGCR Expression in humanen HEK 293T Zellen. Zusammenfassung von n≥3 Experimenten zur Analyse der Effekte typischer Inhibitoren. Typische Hemmstoffe der posttranslationalen Modifikation sind 2-Fluoropalmitinsäure (FPS; inhibiert Palmitoylierung), 2-Hydroxymyristinsäure (HMA; inhibiert Myristoylierung) und Tunikamycin (TM; inhibiert Glykosylierung). Die Phospholipase C (PLC) wird zur Freisetzung von Proteinen, die über einen GPI-Anker in der Membran fixiert sind, angewandt. Nur TM zeigt einen signifikanten Effekt auf die mGCR Expression im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (A). (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: ** $p < 0.01$). In einer orientierenden Messung konnte gezeigt werden, dass eine mGCR-Expressions-Inhibition durch TM konzentrationsabhängig ist (B).

Eine Verankerung von Proteinen in der Außenseite von Plasmamembranen kann mit Hilfe eines GPI-Ankers erfolgen. Die Phospholipase C (PLC) führt zur Freisetzung von Proteinen, welche über GPI-Anker in der Plasmamembran fixiert sind. Die Inkubation von HEK 293T Zellen mit PLC führte nicht zur Verringerung der mGCR Expression auf der Zelloberfläche (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: n.s.). Ebenso zeigten weder die Hemmung der Myristoylierung (als spezifischer Inhibitor wurde 2-Hydroxymyristinsäure (HMA) verwendet) noch der Palmitoylierung (gehemmt mittels 2-Fluoropalmitinsäure (FPS)) Effekte auf die mGCR Expressionsfrequenz (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: n.s.). Im Gegensatz dazu ergab die Inhibition der Glykosylierung mit dem Inhibitor Tunikamycin (TM) eine um etwa 50% verminderte mGCR Expression auf HEK 293T Zellen (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: ** $p < 0.01$).

Es wurde gezeigt, dass verschiedene Zelllinien eine unterschiedlich starke mGCR Expressionsfrequenz aufweisen. Die Jurkat T-Zelllinie exprimiert den mGCR nicht auf der Zelloberfläche. In HEK 293T Zellen ist die mGCR Expression abhängig von der Konfluenz und lässt sich durch Inhibitoren des Proteintransportes (Brefeldin A, Monensin) und der Glykosylierung (Tunikamycin) vermindern.

3.2 Anwendung der RNAi- Technologie zur Klärung der Herkunft der mGCR

Die Herkunft des mGCRs war bis jetzt noch unklar. Die in dieser Arbeit favorisierte „Ein-Gen-Hypothese“ (ein Gen codiert unterschiedliche Moleküle) sollte systematisch durch ein gezieltes Herabregulieren (*Knockdown*) des cGCRs mittels RNAi-Technologie überprüft werden. Dabei stellte sich die Frage, ob es sich bei dem mGCR um eine spezielle Spleißvariante des cGCRs handelt.

Das humane GCR-Gen umfasst ca. 2.5kb an codierender Sequenz, die auf neun Exons verteilt sind. Durch differentielles Spleißen dieser Exons ergibt sich eine Vielzahl von möglichen Kombinationen, wodurch der mGCR sich vom cGCR unterscheiden kann. Die für die Experimente notwendigen siRNA Duplex wurden in Zusammenarbeit mit einer Forschergruppe des Max-Planck-Instituts für Infektionsbiologie entworfen. Letztlich wurde gegen jedes der neun Exons mindestens eine siRNA entworfen, um eine mögliche Spleißvariante als Voraussetzung für die Expression des mGCRs zu identifizieren. Nach Auswahl der Zielstellen wurde bei dem siRNA Design auf das Erreichen einer starken Effizienz (großer Knockdown-Effekt) sowie einer möglichst hohen Spezifität (Vermeidung unspezifischer Wirkungen auf Gene, deren Ausschaltung nicht beabsichtigt ist) geachtet. Des Weiteren wurden unterschiedliche GCR-Knockdown Zelllinien mittels vektorbasierter Technik hergestellt und die Effekte hinsichtlich der mGCR Expression untersucht.

3.2.1 siRNA vermittelte Effekte auf den humanen GCR

3.2.1.1 Zielsequenzen der entwickelten siRNA

Für das Design der siRNAs wurden einige Softwaretools (QIAGEN GmbH) verwendet um eine möglichst hohe Effizienz und Spezifität zu erreichen. Bereit bekannt ist, dass sich vor allem Zielstellen bewährt haben, die mit einem AA-Dinukleotid beginnen. Die 3’-Enden der siRNA Duplex bestehen jeweils aus einem [dTdT]-Überhang (Sequenzen siehe Material und Methoden; Tabelle II.7). Neben den in Voruntersuchungen bereits entworfenen 3 siRNAs (#1; #2; #3), wurden in dieser Arbeit 10 weitere siRNAs entwickelt. Hauptziel war dabei vor allem jedes der 9 Exons des humanen GCR-Gens mindestens einmal als Zielsequenz für die siRNAs zu wählen. Einige der Exons sind dabei von besonderer Bedeutung, da sie wichtige Regionen des Rezeptors codieren. So befindet sich in Exon 2 die Sequenz für die Transaktivierungsdomäne des Rezeptors und die Erkennungsstelle für den zum Nachweis verwendeten monoklonalen Antikörper (Aminosäuren 150 – 176). Auch Exon 5 ist von funktioneller Bedeutung für den humanen GCR, weil es einen Teil der Hormonbindungsdomäne codiert. Ein Überblick der verwendeten siRNAs und der dazu gehörigen Exons ist in Abb. III.4 dargestellt.

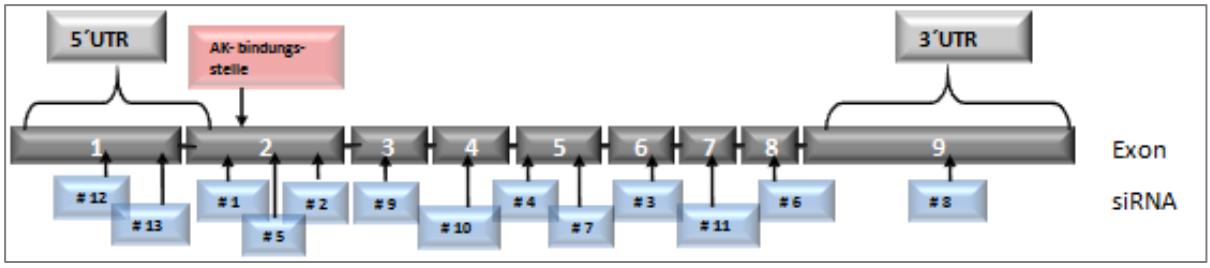

Abbildung. III.4: Zuordnung der entworfenen siRNAs zu den Exons des humanen GCR-Gens. Das humane GCR-Gen beinhaltet 2.5kb codierende Sequenz, welche auf 9 Exons (dunkelgraue Boxen) verteilt sind. Spezifische siRNAs (#1-#13, blaue Boxen) wurden entworfen, um deren Bedeutung für die Expression eines funktionellen mGCRs zu analysieren. Hellgraue Boxen stellen die 3´und 5´UTR, die rote Box die Antikörper-Bindungsstelle dar.

Da sich die siRNA #1 in den Voruntersuchungen als ineffizient erwiesen hatte, wurde diese siRNA in den hier durchgeführten Experimenten nicht weiter verwendet. Die so entwickelten siRNAs wurden mittels RNAiFect in die Zielzellen eingebracht und deren Effizienz bezüglich eines GCR-Knockdowns auf mRNA- und Proteinebene (siehe Abschnitte 2.2.3.1.5 ff und 2.2.3.2.5 ff) überprüft.

3.2.1.2 Effekte auf die GCR mRNA Expression

Nach 48-stündiger Inkubation (37°C, 5% CO2, 21% O2 und 95% Luftfeuchtigkeit) wurde die Knockdown-Effizienz auf mRNA Ebene überprüft. Die cytosolische RNA der transfizierten Zellen wurde mittels RNeasy-Kit (QIAGEN) isoliert, über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und als Template für eine semiquantitative Real-Time-PCR Reaktion eingesetzt.
Die Menge der GCR mRNA nach Transfektion mit siRNA wurde mit der Menge an GCR mRNA nach Transfektion mit Allstars-siRNA verglichen. Eine Normalisierung der RT-PCR Daten aller Transfektionsansätze wurde durch die Bestimmung der Menge an β-Aktin mRNA realisiert und die statistische Analyse fand mittels GraphPad® Prism Software statt (Abb. III.5).

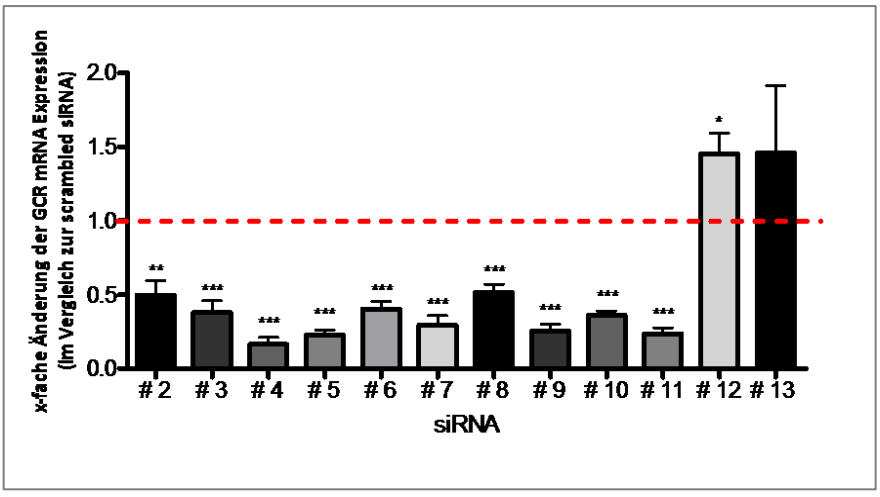

Abbildung III.5: Effekte des siRNA vermittelten GCR Knockdowns auf RNA Ebene. Zusammenfassung von 8-10 Experimenten pro siRNA zur spezifischen Reduktion der GCR mRNA Menge. Alle Werte wurden auf ß-Aktin und auf die scrambled siRNA von QIAGEN normalisiert (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Ermittelt wurde jeweils der Mittelwert (n ≥ 8) und die Standardabweichung des Mittelwertes. Für die statistische Analyse wurde der one-way ANOVA („analysis of variance“) Test (Dunnett`s multiple comparision test) angewandt. Die Auswertung ergab für die siRNAs #2 - #11 (spezifisch für Exons 2-9) eine Reduktion der GCR mRNA Menge um 50 bis 80% im Vergleich zur scrambled siRNA. Die im Exon 1 (im speziellen in der 5´UTR Region des GCR-Gens) befindlichen siRNAs #12 und #13 ergaben im Gegensatz dazu keine Reduktion, sondern, interessanterweise eine Induktion der GCR mRNA Menge um jeweils 50%.

3.2.1.3 Analyse der Reduktion der cGCR Proteinmenge mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Die spezifische Analyse der cGCR Proteinmenge erfolgte etwa 72-96h nach der Transfektion mit siRNA. Die Zellen wurden lysiert, die Proteinmenge mittels BCA Verfahren bestimmt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte über die Immuno-Blot Analyse mit Hilfe des spezifischen GCR-Antikörpers (Klon 5E4). Zur Normalisierung der Western Blot Daten bezüglich der aufgetragenen Proteinmenge wurde für alle Transfektionsansätze ebenfalls die Menge an β-Aktin bestimmt (Abb. III.6).

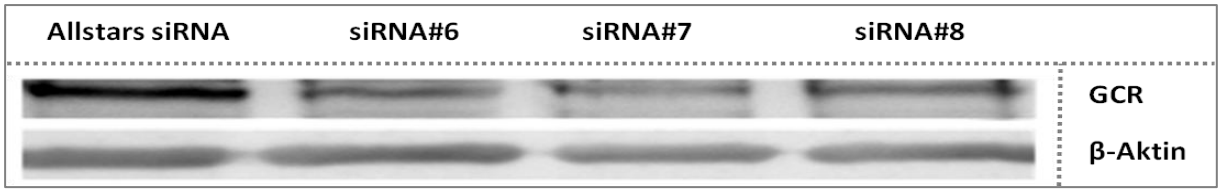

Abbildung III.6: Beispiel für die Effekte des siRNA vermittelten GCR Knockdowns auf Proteinebene. Darstellung eines Western Blot Experiments für 3 unterschiedliche siRNAs und der Allstars siRNA. Neben der Reduktion der GCR Proteinmenge wurde auch die Menge an β-Aktin bestimmt.

Die entsprechenden Proteinsignale wurden mittels ImageJ-Software ausgewertet, wobei die cGCR-Proteinmenge nach Transfektion mit siRNA mit der Proteinmenge nach Transfektion mit der Allstars Negativkontrolle (scrambled siRNA) verglichen wurde (Abb. III.7).

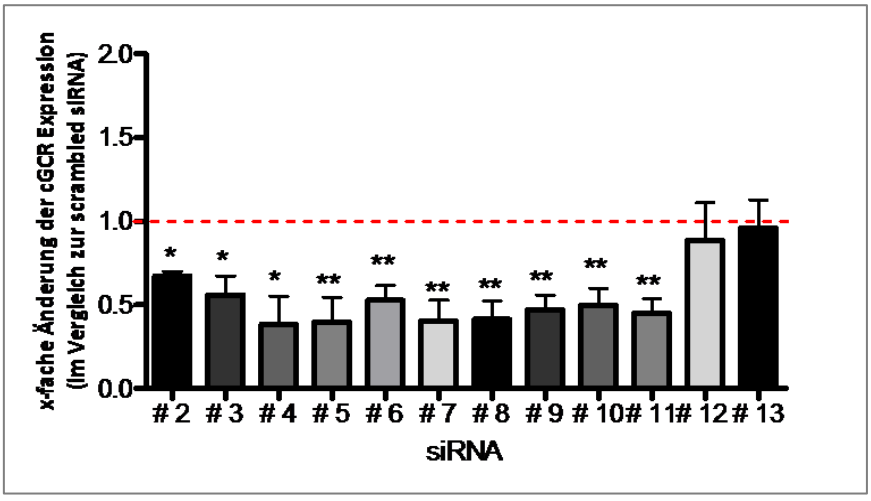

Abbildung III.7: Effekte des siRNA vermittelten GCR Knockdowns auf die cGCR Proteinmenge. Zusammenfassung von 4-7 Experimenten pro siRNA zur spezifischen Reduktion der cGCR Proteinmenge. Alle Werte wurden auf ß-Aktin und auf die scrambled siRNA von QIAGEN normalisiert (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Die Auswertung der Experimente ergab eine deutliche Reduktion der cGCR Proteinmenge um 30 bis 70% für die siRNAs #2 bis #11. Die im Exon 1 angreifenden siRNAs #12 oder #13 zeigten auch hier abweichende Ergebnisse: die cGCR Proteinmenge wurde durch eine Transfektion mit siRNA im Vergleich zur Allstars Negativkontrolle nicht signifikant beeinflusst, sondern blieb nahezu unverändert.

3.2.1.4 Analyse der Reduktion der mGCR Expression mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzanalyse

Die spezifische Analyse der mGCR Expression erfolgte etwa 72-96h nach Transfektion mit siRNA. Die Zellen wurden mittels Accutase (PAA Laboratories GmbH) von der Oberfläche gelöst. In einer Neubauer-Zählkammer (VEB Jenoptic) wurde die Zellzahl bestimmt und mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 2.2.2.8.1) erfolgte die Färbung der membranständigen Glucocorticoidrezeptoren auf der Oberfläche. Um tote Zellen von der Analyse auszuschließen, wurde Propidiumjodid direkt vor der durchflusszytometrischen Messung am FACS Calibur zugegeben.
Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen FCS Express und FlowJo® sowohl hinsichtlich des prozentualen Anteils an mGCR exprimierenden Zellen, als auch hinsichtlich der mGCR Expression pro Zelle, welche sich über das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität darstellt (Abb. III.8).

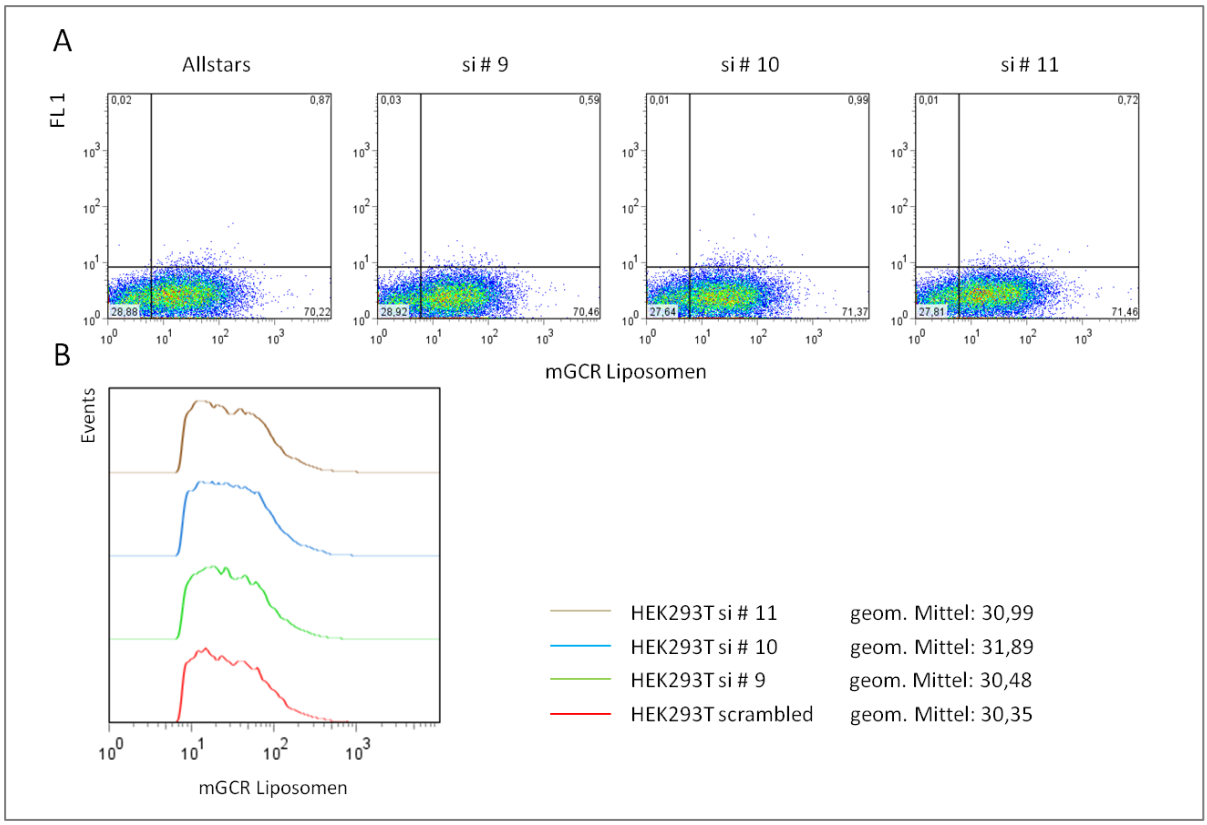

Abbildung III.8: Beispiel für Effekte des siRNA vermittelten GCR Knockdowns auf mGCR Proteinebene. Die mit siRNA transfizierten Zellen wurden mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung hinsichtlich der Effekte auf die mGCR Protein-Expression überprüft. Eine Oberflächenfärbung zeigte für die siRNAs #9, #10 und #11 keine Effekte auf den prozentualen Anteil (A, DotPlots), als auch auf die mittlere Fluoreszenzintensität (B, Histogramm) im Vergleich zur Negativkontrolle (scrambled Allstars siRNA).

Die Ergebnisse aus jeweils 3 Messungen pro siRNA zeigten, dass aus der oben beschriebenen Reduktion der GCR mRNA Menge und der cGCR Proteinmenge keine signifikante Verminderung der mGCR-Expression resultierte, weder hinsichtlich des prozentualen Anteils (Abb. III.9), noch hinsichtlich des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität (nicht gezeigt).

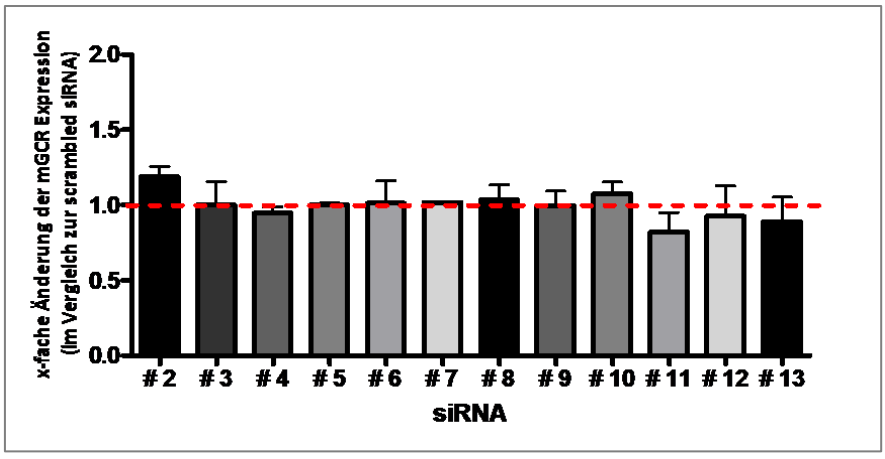

Abbildung III.9: Einfluss des siRNA vermittelten GCR Knockdowns auf die mGCR Expression. Zusammenfassung von 3 Experimenten pro siRNA zur spezifischen Reduktion der mGCR Proteinmenge. Alle Werte wurden auf die scrambled siRNA von QIAGEN normalisiert (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: n.s.).

Zehn der insgesamt zwölf etablierten siRNAs zeigten eine deutliche Reduktion der GCR mRNA- und cGCR Proteinmenge, wobei keine der siRNAs eine signifikante (one-way ANOVA) Verminderung der mGCR Expression zeigte. Beide siRNAs (#12, #13), welche in der 5`UTR des Exons 1 binden, bewirkten eine Induktion der GCR mRNA Expression, was keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinexpression (sowohl des cytosolischen als auch membranständigen Rezeptors) hat. Eine Übersicht aller berechneten Mittelwerte der Änderung der Gen-/Protein-Expression im Vergleich zur scrambled Negativkontrolle, ist in Tabelle III.1 dargestellt.

Tabelle III.1: Übersicht aller siRNA vermittelten Effekte

siRNA	**# 2**	**# 3**	**# 4**	**# 5**	**# 6**	**# 7**	**# 8**	**# 9**	**# 10**	**# 11**	**# 12**	**# 13**
RNA Level	0,50	0,38	0,16	0,23	0,40	0,29	0,52	0,25	0,36	0,24	1,45	1,02
Protein Level cGCR	0,67	0,56	0,38	0,40	0,53	0,41	0,41	0,35	0,45	0,33	0,88	0,76
mGCR Expression	1,19	1,00	0,95	1,00	1,01	1,02	1,04	0,99	1,08	0,82	0,93	0,89

Die mit Hilfe der siRNA Technologie vermittelte Herabregulation des humanen GCR-Gens führte also lediglich zu einem zeitlich begrenzten Effekt auf die Proteinexpression. Zeitlich verzögerte Effekte konnten durch dieses experimentelle Herangehen allerdings nicht erfasst werden.

3.2.2 shRNA vermittelte Effekte auf den humanen GCR

3.2.2.1 Etablierung von stabilen HEK 293T GCR-Knockdown Zelllinien

Zur Erzeugung eines, über längere Zeit stabilen GCR-Knockdowns, wurde eine vektorbasierte Technik genutzt, um die shRNA-Moleküle (*short hairpin RNA*) in die Zelle einzuschleusen [168]. Als Grundlage zur Klonierung der Vektorkonstrukte diente das Plasmid pLentiLox 3.7 (*pLL3.7*), welches einen RNA Polymerase III-U6-Promotor mit anschließender Klonierungsstelle zum Einbau der sh-Oligonukleotide beinhaltet. Durch den Selektionsmarker eGFP (*enhanced green fluorescent protein),* welcher unter der Kontrolle des CMV–Promotors steht, wird die Detektion Plasmid-tragender Zellen ermöglicht. Die Klonierung erfolgte über die Schnittstellen KspA1 (auch HpaI genannt) und XhoI. Insgesamt wurden 3 verschiedene shRNAs auf Grundlage der siRNAs entworfen. Dabei wurden die shRNA Sequenzen so gewählt, dass die Zielsequenzen in unterschiedlichen Exons des GCRs Gens liegen. Dies sollte der Identifikation einer eventuellen alternativen Spleißform dienen, welche den mGCR kodiert. Die shRNA 1 (*sh1*) ist entsprechend der siRNA #2, die shRNA 2 (*sh2*) wurde mit der Sequenz der siRNA #4 entworfen und die shRNA 3 (*sh3*) entstand auf der Grundlage von siRNA #11. Die ursprünglichen siRNAs, deren Zielexons und deren Effekte auf mRNA und Protein-Expression im Vergleich zur scrambled siRNA sind in Tabelle III.2 gezeigt.

Tabelle III.2: Entworfene shRNAs aus siRNA Sequenzen

GCR shRNA	GCR siRNA	Zielexon	Knockdown mRNA Ebene	Knockdown cGCR Level	Knockdown mGCR Level
sh1	#2	2	0,50	0,67	1,19
sh2	#4	5	0,16	0,38	0,95
sh3	#11	7	0,24	0,33	0,82

Die Sequenzen wurden so modifiziert, dass sie in das Plasmid kloniert werden konnten. Dafür wurde am Anfang jeder *sense*- Sequenz ein Thymidin-Nukleotid eingefügt, damit nach dem Schnitt mit KspA1 das letzte Nukleotid der U6-Promotorsequenz rekonstruiert werden konnte. Am 5'-Ende des *antisense*- Stranges wurde ein XhoI-Überhang und als loop-Sequenz die von Brummelkamp *et al*. [169] publizierte Sequenz eingefügt. Durch Annealing der shRNA Oligonukleotide wurden doppelsträngige Moleküle erzeugt, die anschließend phosphoryliert wurden. Nach dem KspA1/XhoI Endonuklease II Restriktionsverdau erfolgte die Ligation des doppelsträngigen shRNA Oligonukleotid mit dem dephosphorylierten *pLL3.7*-Plasmid. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde zur Transformation chemokompetenter Bakterienzellen verwendet. Zur Überprüfung der positiven Klone wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Unter Verwendung der entworfenen PCR-Primer pll.for/pll.rev wurde im Falle eines Plasmids ohne Insert ein PCR-Produkt von 239bp generiert. Fand eine Integration des Inserts statt, konnte ein PCR-Produkt von 289bp nachgewiesen werden (Abb. III.10).

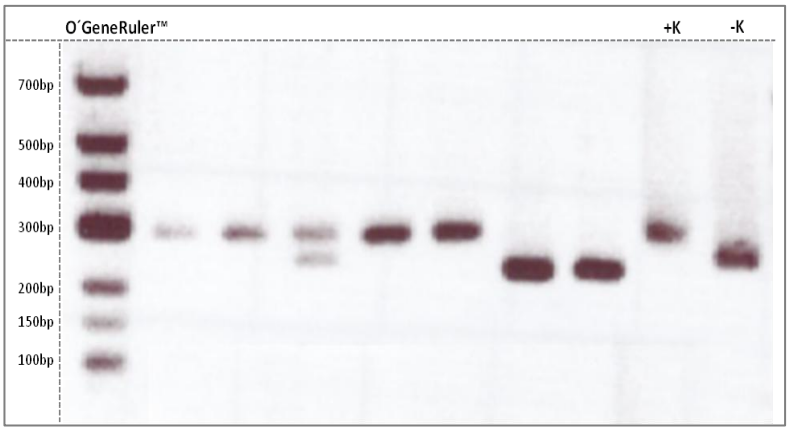

Abbildung III.10: Nachweis positiver pLL3.7 GCR sh3 Klone mittels Kolonie-PCR. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Insertion der shRNA #3 in das *pLL3.7*-Plasmid wurde eine Kolonie-PCR von mehreren Klonen durchgeführt. Von einem Plasmid ohne Insert wird ein PCR-Produkt von 239bp (-K), von einem Plasmid mit Insert ein PCR-Produkt von 289bp (+K) generiert. + K – Kolonie-PCR des bestätigten pLL3.7 GCR sh1 Plasmids; -K – Kolonie-PCR des leeren pLL3.7 Plasmids.

Die Sequenz des Inserts wurde mittels Sequenzierung überprüft (siehe Abschnitt 2.2.3.1.4; Abb. III.11).

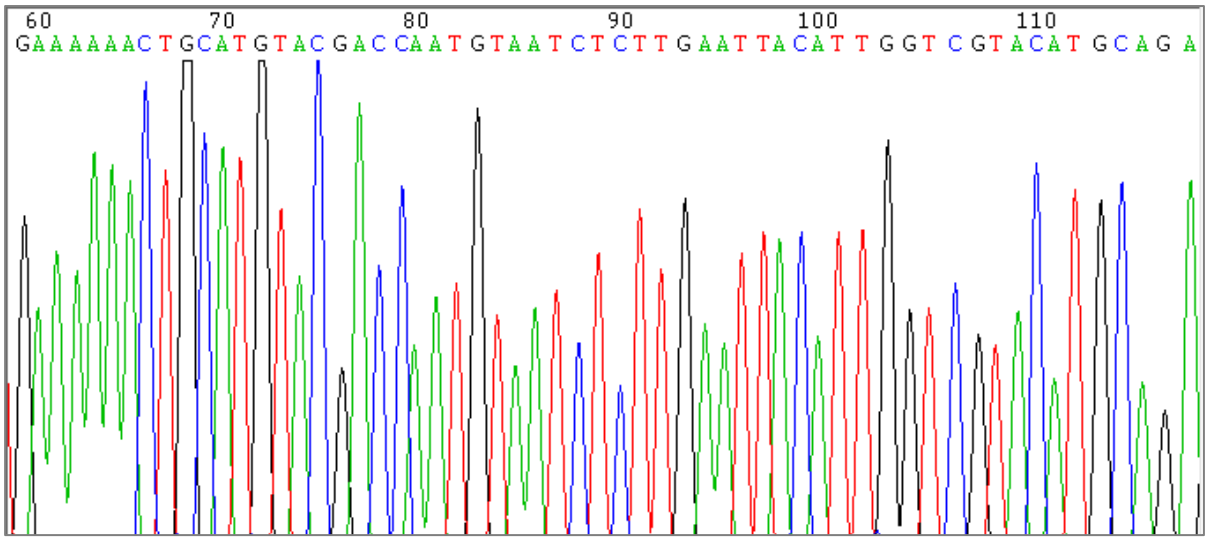

Abbildung III.11: Ergebnis einer Sequenzierung des pLL 3.7 GCR sh3 Plasmids. Zur abschliessenden Kontrolle einer fehlerfreien Insertion des sh3 Oligonukleotids in den pLL 3.7 Vektor wurde eine Sequenzierung nach der leicht abgewandelten Sanger-Methode durchgeführt. Durch Zugabe von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden konnten die Fluoreszenzsignale ausgelesen und den entsprechenden Basen zugeordnet werden.

Mit Hilfe dieser Technik konnte für jede der drei entworfenen shRNAs ein fehlerfreies Plasmid identifiziert werden, welches mittels Midi-Plasmid-Präparation (NucleoBond® Xtra Midi) in größerem Maßstab hergestellt wurde.

Von diesen Plasmiden und einer scrambled Negativkontrolle (pLL3.7 scr), welche keine Effekte auf die GCR Expression aufweist, wurden die entsprechenden Viren mittels Calcium-Phosphat Präzipitation in HEK 293T Zellen hergestellt und anhand des Selektionsmarkers eGFP die Transfektionsrate mittels FACS Calibur bestimmt. Das jeweilige Plasmid wurde anschließend mittels viraler Transduktion in die HEK 293T Zellen eingebracht. Um erfolgreich transduzierte Zellen anzureichern, wurden transduzierte HEK 293T Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung anhand des eGFPs sortiert. Die Reinheit der eGFP-

positiven Zellpopulation wurde wiederum mittels FACS Calibur vor und nach Sortierung gemessen (Abb. III.12 und Tab. III.3).

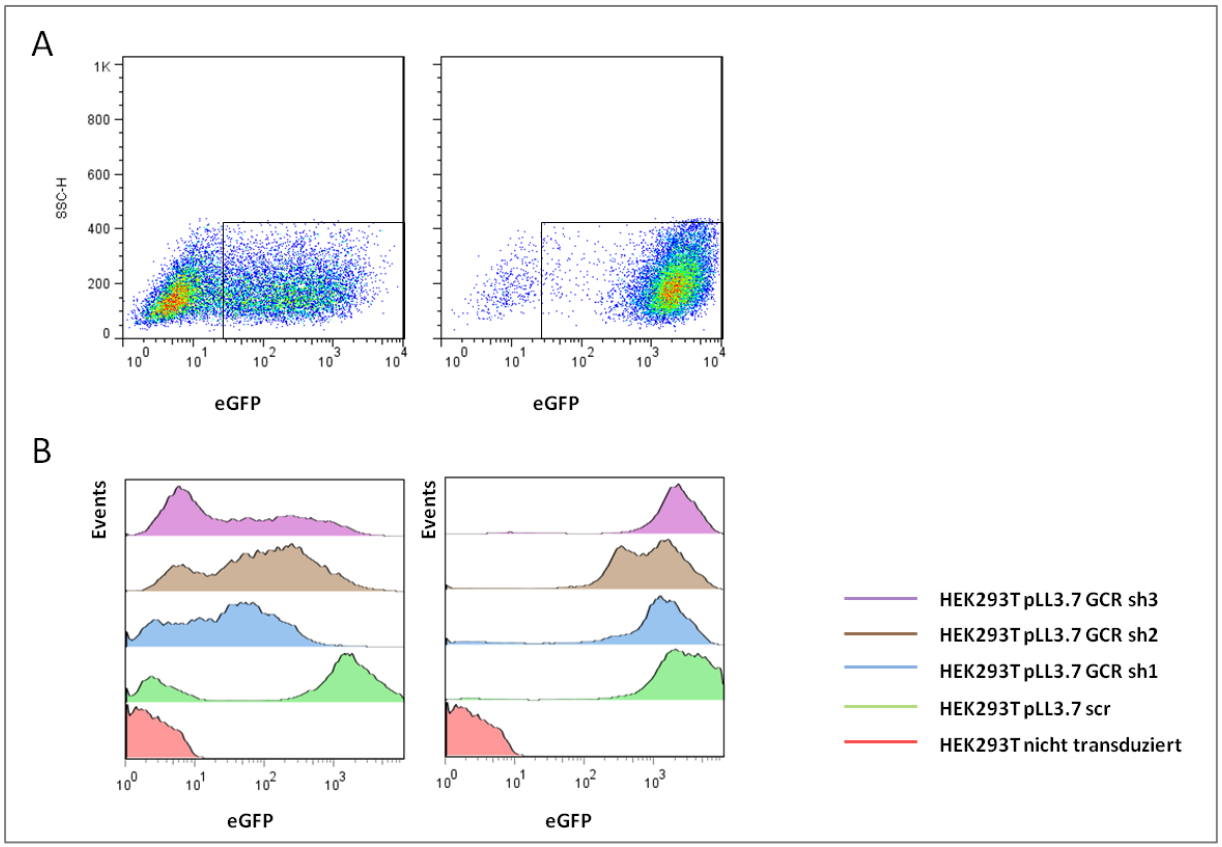

Abbildung III.12: Anreicherung positiv transduzierter HEK 293T Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung. Die mit shRNA transduzierten Zellen wurden mittels FACS Calibur hinsichtlich ihrer Transduktionseffizienz vor und nach Sortierung über eGFP überprüft. Mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung wurden mit pLL.3.7 GCR sh3 positiv transduzierte Zellen stark angereichert (A, DotPlot Darstellung (links) vor Sortierung und (rechts) nach Sortierung). Alle mit shRNA transduzierten HEK 293T Zellen wurden auf diese Weise angereichert (B, Histogramm Darstellung aller Zelllinien (links) vor und (rechts) nach Anreicherung über eGFP).

Tabelle III.3: Anreicherung der eGFP positiven HEK 293T Zellen

Plasmid	% eGFP positiver Zellen vor Sortierung	% eGFP positiver Zellen nach Sortierung
pLL 3.7 scr	89.13	91.96
pLL 3.7 GCR sh1	52.19	89.19
pLL 3.7 GCR sh2	69.97	96.74
pLL 3.7 GCR sh3	45.79	96.30

Die Effizienz der Transduktion der verschiedenen pLL 3.7 Plasmide in die HEK 293T Zellen lag zwischen 45,79% (pLL 3.7 GCR sh3) und 89,13% (pLL 3.7 scr). Diese Abweichungen (entstanden durch die unterschiedlich effektiven Virenüberstände) wurden mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung so minimiert, dass die Zahl eGFP positiver Zellen nach Anreicherung zwischen 89,19% (pLL 3.7 GCR sh1) und 96,74% (pLL 3.7 GCR sh2) lag.

Eine erste Beobachtung die GCR-Knockdown Zelllinien betreffend war, dass Zellen, die mit Plasmiden des GCR Knockdowns transduziert wurden, nicht so schnell nach der Transduktion adhärierten. Die Zellen die mit einem scrambled Plasmid infiziert wurden oder die Wildtyp HEK 293T Zellen selbst adhärierten nach dem Transduktionsprozess wieder normal.
Um sicherzustellen, dass alle erzielten Ergebnisse reproduzierbar sind, wurden alle Kontroll- und auch Knockdown Zelllinien ein zweites Mal hergestellt und der Anteil positiv transduzierter Zellen erhöht. Die so erhaltenen scr-Kontroll- und GCR-Knockdown Zelllinien waren über mehrere Wochen bis hin zu 3 Monaten stabil, was regelmäßig durch Bestimmung des Anteils an eGFP positiven Zellen kontrolliert wurde.

3.2.2.2 Effekte auf die GCR mRNA Expression

Zur Kontrolle der Effizienz des shRNA vermittelten GCR-Knockdowns wurde aus den entsprechenden HEK 293T Zellen (prozentualer Anteil an eGFP ≥ 90%) die cytosolische RNA isoliert und eine semiquantitative Real-Time-PCR durchgeführt. Die Menge der GCR mRNA nach Transduktion mit shRNA enthaltenden Plasmid wurde mit der Menge an GCR mRNA nach Transduktion mit dem Kontrollplasmid pLL3.7 scr verglichen. Zur Normalisierung der RT-PCR Daten wurde die Menge an β-Aktin mRNA bestimmt, um eine Quantifizierung zu ermöglichen. Die statistische Analyse fand mittels GraphPad® Prism Software statt (Abb. III.13).

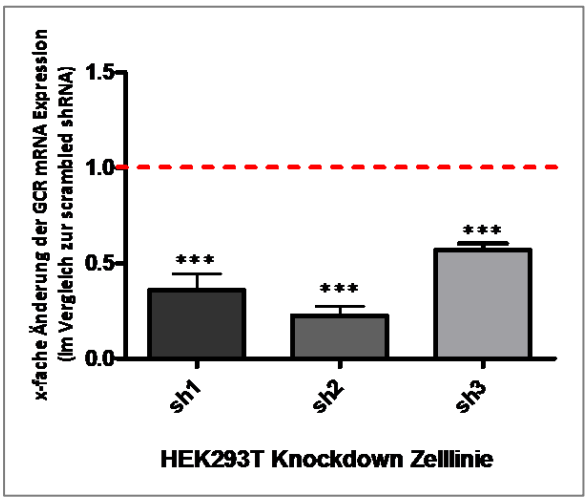

Abbildung III.13: Effekte des shRNA vermittelten GCR Knockdowns auf RNA Ebene. Zusammenfassung von 6-12 Experimenten pro shRNA zur spezifischen Reduktion der GCR mRNA Menge. Alle Werte wurden auf ß-Aktin und auf die scrambled shRNA normalisiert (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: *** $p < 0.001$).

Die Auswertung der Mittelwerte ($n \geq 6$) ergab für alle 3 Zelllinien eine signifikante (one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: $p < 0.001$) Reduktion der GCR mRNA Menge um 43,12% (sh3); 64,25% (sh1) und 77,52% (sh2).

3.2.2.3 Reportergenassay zur funktionellen Kontrolle des GCR-Knockdowns

Zur zusätzlichen Überprüfung der Funktionalität des GCR-Knockdowns wurde in einer orientierenden Messung ein Luciferase-Reportergenassay für die drei shRNA enthaltenden HEK 293T Zelllinien durchgeführt. Dazu wurden die transduzierten HEK 293T Zellen mit dem

pGRE-Luc Vektor transfiziert und mit dem Glucocorticoid Dexamethason inkubiert. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität mittels Stop&Glow Substrat und dem GloMax® 96 Luminometer (beides Promega) bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.3.2.10) und die erhaltenen Werte für die shRNA enthaltenden Zellen auf die HEK 293T pLL 3.7 scr Kontrolle normalisiert (Abb.III.14).

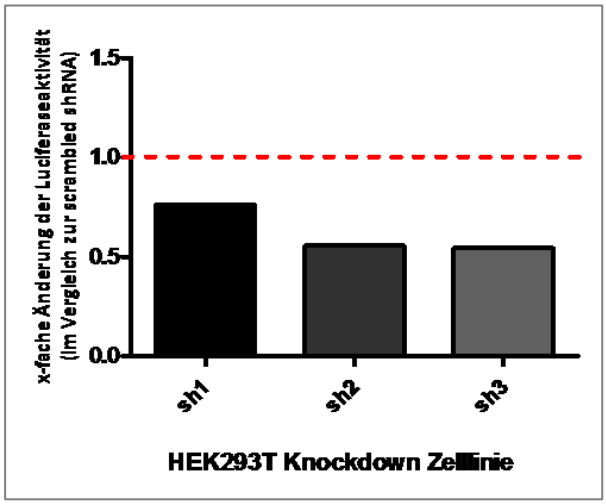

Abbildung III.14: Nachweis der Funktionalität des stabilen GCR-Knockdowns mittels Reportergenassay. Die Auswirkung des GCR-Knockdown via shRNA wurde mittels einmaliger Messung der Luciferaseaktivität bestimmt. Zur Normalisierung wurde eine Renilla Luciferase cotransfiziert. Dargestellt ist die Änderung im Vergleich zur Negativkontrolle HEK 293T pLL 3.7 scr.

Der Knockdown des GCRs zeigte in einer orientierenden Messung eine deutlich verringerte Firefly Luciferaseaktivität im Vergleich zu den HEK 293T pLL 3.7scr Zellen um 23,93% (sh1); 44,49% (sh2) und 45,53 % (sh3).

3.2.2.4 Analyse der Reduktion der cGCR Proteinmenge mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Für die spezifische Analyse der GCR Proteinmenge des shRNA vermittelten GCR-Knockdowns, wurden Zelllysate der entsprechenden HEK 293T Zellen (prozentualer Anteil an eGFP ≥ 90%) mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion analysiert. Die entsprechenden Proteinsignale wurden mittels ImageJ-Software ausgewertet, und es wurde die GCR Proteinmenge der HEK 293T-Knockdown Zelllinien mit der Proteinmenge der GCR pLL 3.7scr Zelllinie verglichen. Zur Normalisierung wurde die Menge an β-Aktin bestimmt (Abb. III.15).

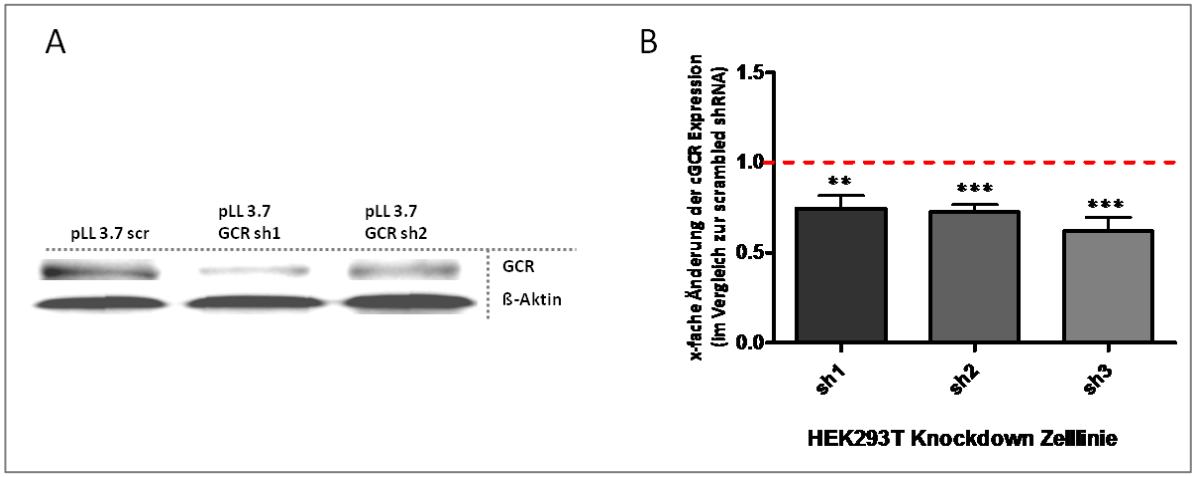

Abbildung III.15: Effekte des shRNA vermittelten GCR Knockdowns auf cGCR Proteinebene. Darstellung eines Western Blot Experiments für 2 unterschiedliche shRNAs und der scrambled shRNA (A). Neben der Reduktion der GCR Proteinmenge wurde auch die Menge an β-Aktin bestimmt, um eine Normalisierung auf die Gesamtproteinmenge zu gewährleisten. Zusammenfassung von 6-9 Experimenten pro shRNA zur spezifischen Reduktion der cGCR Proteinmenge. Alle Werte wurden auf ß-Aktin und auf die scrambled shRNA enthaltenden HEK 293T Zellen normalisiert (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Die Auswertung der Experimente ($n \geq 6$) zeigte eine signifikante Reduktion der GCR Proteinmenge um 25,61% (sh1), 27,47% (sh2) und 38,02% (sh3).

3.2.2.5 Analyse der Reduktion der mGCR Expression mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzanalyse

Die Analyse der mGCR Expression erfolgte für die entsprechenden HEK 293T Zellen (prozentualer Anteil an eGFP ≥ 90%) mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 2.2.2.8.1). Um die wenigen verbleibenden, nicht viral transduzierten Zellen von der Analyse auszuschließen, wurde die Auswertung der Daten (mittels FCS Express und FlowJo®) nur auf die eGFP positiven Zellen bezogen (Abb. III.16).

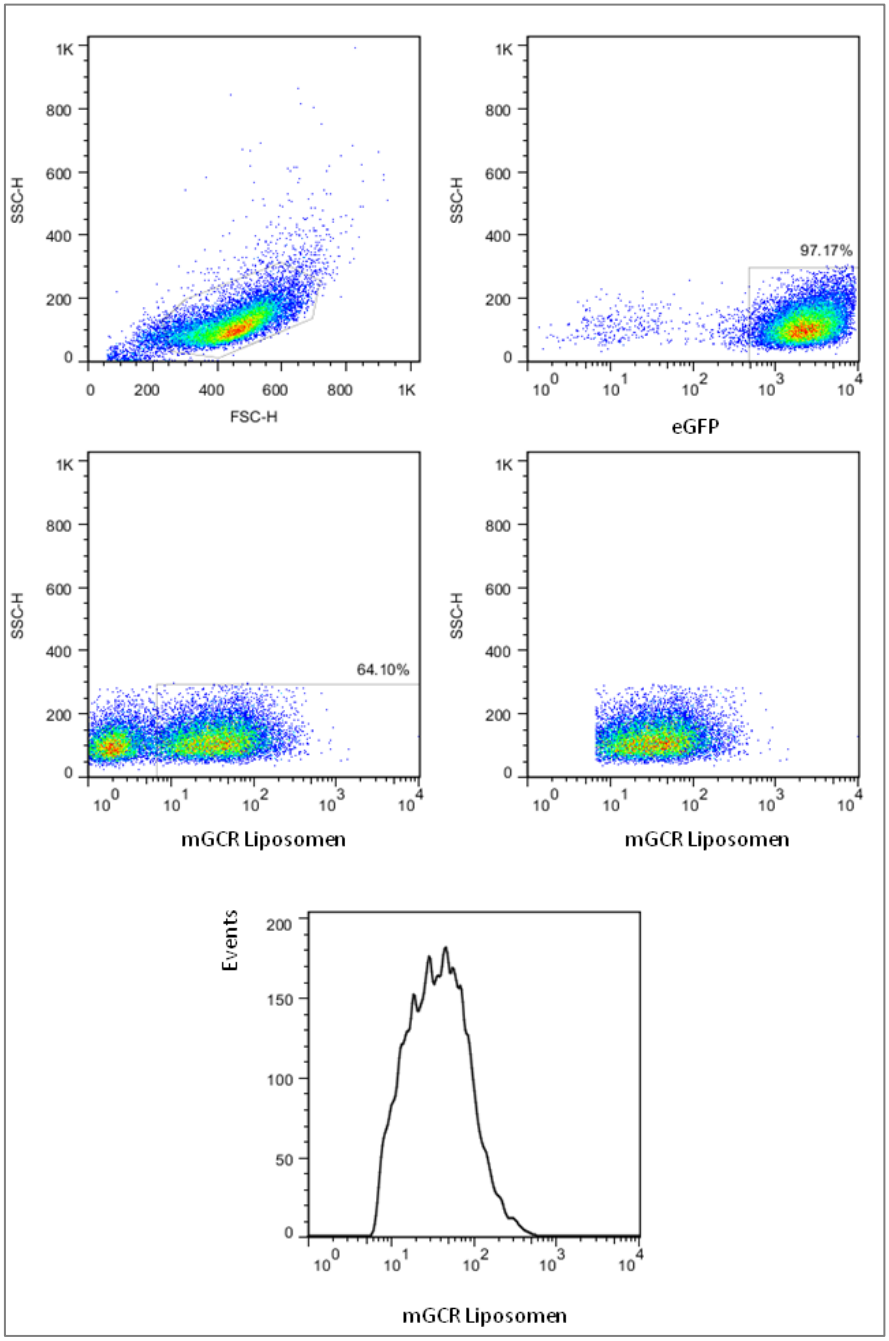

Abbildung III.16: Gatingstrategie zur Auswertung mGCR positiver Zellen. Um in der Analyse der Daten der Immunfluoreszenzmessungen die Daten durch Einbeziehen eGFP negativer Zellen nicht zu verfälschen, wurden die Daten stets nach folgender Strategie (hier anhand der Zelllinie HEK 293T GCR sh3 gezeigt) ausgewertet: Im Vorwärts-Seitwärts-Scatter wurden Zelltrümmer ausgegrenzt (obere Reihe, links) und anschließend auf die eGFP positiven Zellen gegatet (obere Reihe, rechts). Lediglich die eGFP positiven Zellen wurden in die mGCR Analyse einbezogen (mittlere Reihe, links). Die Bestimmung des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensitäten (untere Reihe) wurde für die mGCR positiven HEK 293T GCR sh3 Zellen durchgeführt (mittlere Reihe, rechts).

Eine Analyse erfolgte sowohl hinsichtlich des prozentualen Anteils an mGCR exprimierenden Zellen, als auch hinsichtlich der mGCR Expression pro Zelle, welche sich über das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität darstellt (Abb. III.17).

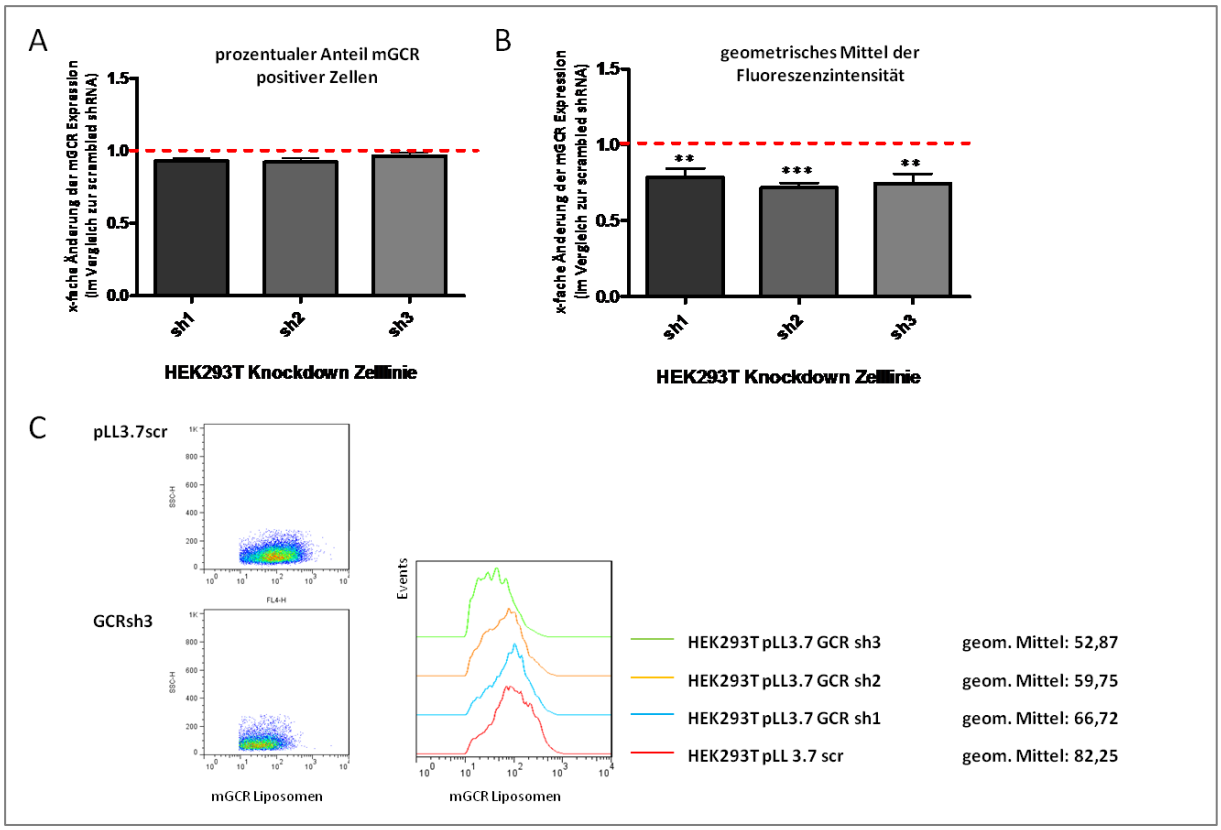

Abbildung III.17: Effekte des shRNA vermittelten GCR-Knockdowns auf mGCR Ebene. Die mit shRNA transduzierten Zellen wurden mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung hinsichtlich der Effekte auf die mGCR Expression überprüft. Eine Oberflächenfärbung zeigte für alle shRNAs keine signifikanten Effekte auf den prozentualen Anteil an mGCR positiven Zellen (A). Hinsichtlich der mittleren Fluoreszenzintensitäten (B) zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle (pLL. 3.7scr) eine signifikante Reduktion der mGCR Expression pro Zelle (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), was deutlich sowohl im DotPlot (C, links) als auch im Histogramm (C, rechts) sichtbar war.

Die Ergebnisse aus den Messungen ($n \geq 10$) zeigten, dass aus der oben beschriebenen Reduktion von GCR mRNA und cGCR Proteinmenge keine signifikante Reduktion des prozentualen Anteils an mGCR exprimierenden Zellen resultiert. Eine Auswertung über das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität, welches im Gegensatz dazu anzeigt, wie die Intensität der Fluoreszenz pro Zelle verändert wird, zeigte eine signifikante Verminderung der mGCR Expression um 21,54% (sh1), 28,32% (sh2) und 25,48% (sh3) (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes, one way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Es wurde also erstmals gezeigt, dass die Zahl der mGCR exprimierenden Zellen zwar gleich bleibt, aber die Zahl der Rezeptoren pro Zelle abnimmt.

3.2.2.6 Analyse der Effekte eines durch mehrere shRNAs vermittelten Knockdowns

Es wurde überprüft ob eine weitere Transduktion der bereits transduzierten Zellen mit einer zweiten, unterschiedlichen shRNA eine Steigerung der Effekte auf die bereits vorhandenen GCR-Knockdown Zelllinien zur Folge hat. Hierfür wurden die Zelllinien HEK 293T pLL3.7 GCR sh1 und HEK 293T pLL3.7 GCR sh2 mit den shRNAs #2 bzw. #3 transduziert. Um die

Reproduzierbarkeit nachzuweisen wurden die beiden Doppel-Knockdown-Zelllinien (HEK 293TpLL3.7 GCR sh1+2 und - sh2+3) ein zweites Mal hergestellt. Zusätzlich wurde eine Zelllinie etabliert, welche einen Knockdown über alle drei shRNAs vermittelt (HEK 293TpLL3.7 GCR sh1+2+3), indem die HEK 293TpLL3.7 GCR sh1+2 Zellen zusätzlich mit der shRNA #3 transduziert wurden. Die Transduktionseffizienz wurde stets durch das Mitführen einer einzelnen Transduktion von unbehandelten HEK 293T Zellen überprüft.
Die Kontrolle der Effizienz des shRNA vermittelten GCR-Knockdowns wurde auf mRNA Ebene mittels semiquantitative Real-Time-PCR (siehe Abb. III.18 A), die Funktionalität mittels Luciferase-Reportergenassay (siehe 3.1.2.3) (siehe Abb. III.18 B), als auch die Auswirkungen auf Proteinebene (cytosolischer Rezeptor) mittels Immunoblot durchgeführt (Abb. III.18 C).

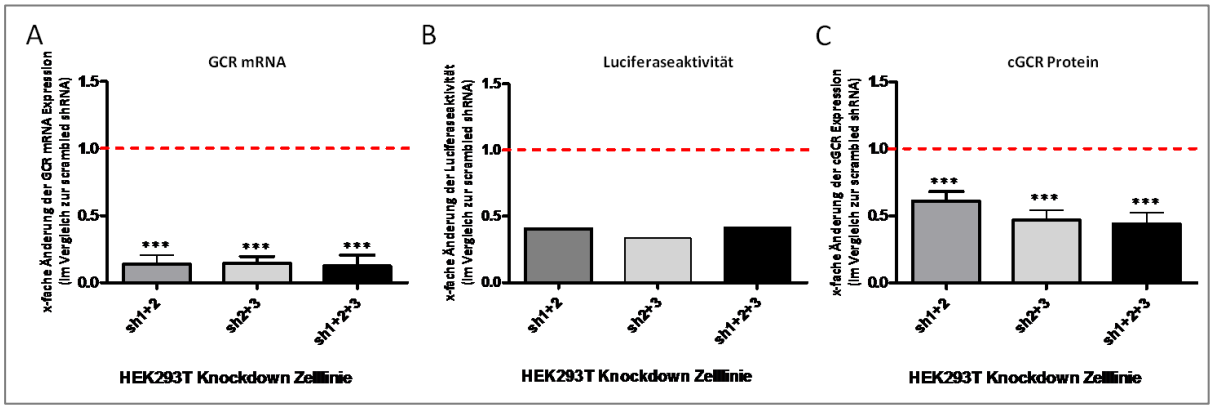

Abbildung III.18: Kontrolle der Funktionalität des stabilen GCR Mehrfach-Knockdowns. Die Zelllinien, bei welchen das GCR-Gen mit mehreren shRNA Konstrukten gleichzeitig herabreguliert wurde, zeigten eine signifikante Reduktion der GCR mRNA Menge (n ≥ 4; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: *** $p < 0.001$) (A). Die Funktionalität dieses Knockdowns wurde mittels einmaliger Messung der Luciferaseaktivität verifiziert (Werte wurden normalisiert auf die Renilla Luciferaseaktivität und die scrambled Kontrolle) (B). Auch der Proteingehalt an cytosolischem GCR (mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion im Vergleich zur HEK 293T pLL3.7 scr Kontrolle ermittelt) wurde signifikant reduziert (n ≥ 4; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: *** $p < 0.001$) (C).

Die Auswertung der Mittelwerte (n ≥ 4) ergab für alle 3 Mehrfach-Knockdown-Zelllinien eine hoch signifikante (one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: $p < 0.001$) Reduktion der GCR mRNA Menge um mehr als 80% (86,19% für sh1+2, 85,59% für sh2+3 und 87,56% für sh1+2+3). Diese Zelllinien zeigten im Vergleich zu den HEK 293T pLL 3.7scr Zellen in einer orientierenden Messung eine deutlich verringerte Firefly Luciferaseaktivität um 59,47% (sh1+2), 66,62% (sh2+3) und 58,07% (sh 1+2+3). Die Analyse der Reduktion der cGCR Proteinmenge zeigte für n ≥ 4 einen signifikanten (one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: $p < 0.001$) Knockdown um 38,79% für sh1+2, 53% für sh2+3 und 55,90% für den Dreifach-Knockdown mit sh1+2+3.

Die Analyse der mGCR Expression erfolgte nach Protokoll (siehe Abschnitt 2.2.2.8.1) für die eGFP positiven Zellen mittels FCS Express und FlowJo®. Eine Analyse erfolgte sowohl hinsichtlich des prozentualen Anteils an mGCR exprimierenden Zellen, als auch hinsichtlich

der mGCR Expression pro Zelle, welche sich über das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität darstellt (Abb. III.19).

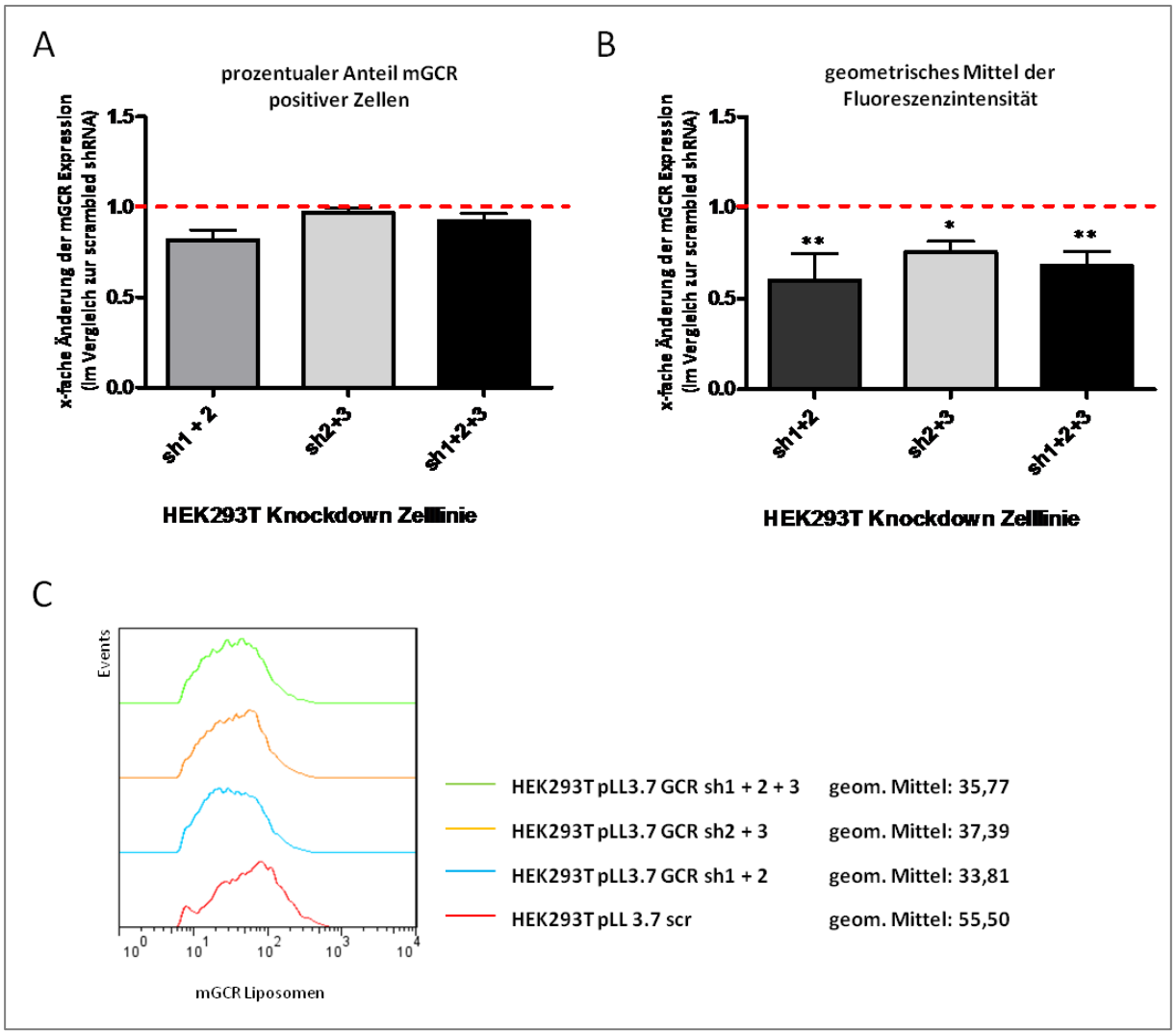

Abbildung III.19: Effekte des shRNA vermittelten Mehrfach-Knockdowns auf mGCR Ebene. Die mit unterschiedlichen shRNAs transduzierten Zellen wurden mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung hinsichtlich der Effekte auf die mGCR Expression in 4 bis 5 unabhängigen Versuchen überprüft. Eine Oberflächenfärbung zeigte für alle shRNAs keine signifikanten Änderungen des prozentualen Anteils an mGCR positiven Zellen (A). Hinsichtlich der mittleren Fluoreszenzintensitäten zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle (pLL. 3.7scr) eine signifikante Reduktion der mGCR Expression pro Zelle (B) (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), was vor allem im Histogramm deutlich sichtbar war (C).

Die Auswertung der ≥4 Messungen ergab keine signifikante Reduktion des prozentualen Anteils an mGCR exprimierenden Zellen. Eine Auswertung der Fluoreszenzintensität pro Zelle über das geometrische Mittel zeigte eine signifikante Verminderung der mGCR Expression um 24,4% (sh2+3), 34% (sh1+2+3) bis hin zu 40% (sh1+2) für die GCR Mehrfach-Knockdown-Zelllinien (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes, one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Sowohl die drei entworfenen, als auch die durch mehrfache Transduktion mit verschiedenen shRNA entstandenen GCR-Knockdown-Zelllinien zeigten eine deutliche Reduktion der GCR mRNA- und Proteinmenge. Eine Betrachtung der Knockdown-Effekte hinsichtlich der mGCR Expression zeigte, dass keine der shRNAs eine signifikante Verminderung der Zahl an mGCR-positiven Zellen zur Folge hatte, obwohl eine dahin gehende Tendenz in einigen Zelllinien zu erkennen war. Bei der Bewertung des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität, welches die Intensität der Fluoreszenz pro Zelle darstellt, zeigte sich jedoch für alle shRNAs eine deutliche und signifikante Intensitätsminderung. Es konnte somit also erstmals gezeigt werden, dass mittels RNAi-Technologie die Anzahl der mGCR Moleküle pro Zelle signifikant vermindert wird. Eine Übersicht aller berechneten Mittelwerte der faktoriellen Änderung der Gen-/Protein-Expression im Vergleich zur scrambled Negativkontrolle ist in Tabelle III.4 dargestellt.

Tabelle III.4: Übersicht aller shRNA vermittelten Effekte

shRNA	**1**	**2**	**3**	**1+2**	**2+3**	**1+2+3**
RNA Level	0,36	0,23	0,57	0,14	0,14	0,12
Protein Level cGCR	0,74	0,73	0,62	0,45	0,47	0,44
mGCR Expression	0,78	0,72	0,75	0,60	0,76	0,68

3.3 Anwendung einer Immunpräzipitation zur Isolation des mGCRs aus humanen Monozyten

Um die Herkunft, und eine damit einhergehende Modifikation des mGCRs weiter zu untersuchen, soll nun das Protein selbst aus der Zelle isoliert werden. Der humane mGCR wird jedoch in so geringer Menge von den Zellen exprimiert, dass dieser nur mittels Liposomen-Verstärkersystem auf der Oberfläche von Zellen nachgewiesen werden kann (siehe Abschnitt 2.2.2.8.1). Zur Anreicherung von Proteinen, welche in sehr geringer Konzentration in Zellen vorkommen, eignet sich die Methode der Immunpräzipitation (IP). Bei dieser Methode wird das zu untersuchende Antigen mittels spezifischen Antikörpers aus einer Lösung aufkonzentriert.

3.3.1 Etablierung der Methode der Immunpräzipitation mittels cytosolischen Glucocorticoidrezeptors

Der humane cGCR wird in großer Menge in der Zelle exprimiert und lässt sich daher problemlos mittels Western Blot Analyse nachweisen. Zur Etablierung einer IP für den GCR wurden Gesamtzelllysate von $10*10^6$ HEK 293T Zellen verwendet. Von diesem Lysat wurde nach Herstellerangaben (Chromatin IP Kit; Upstate) eine IP mit dem anti-GCR Antikörper (Klon 5E4) durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.3.2.9/I). Die so gewonnenen Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot und Immunodetektion nachgewiesen (Abb.III.20).

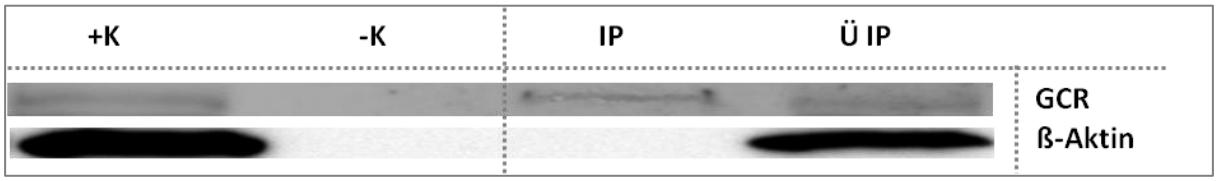

Abbildung III.20: Beispiel für eine Western Blot Analyse einer GCR-IP nach Standardprotokoll. Als Positivkontrolle (+K) wurde eine entsprechende Menge an Zelllysat der HEK 293T Zellen aufgetragen. Als Negativkontrolle (-K) wurde HEK 293T Zelllysat ohne Antikörper parallel zur Immunpräzipitation (IP) mit anti-GCR Antikörper über Nacht unter Rotation inkubiert. Nach Inkubation der Ansätze für 1h mit Protein A Agarose und mehreren Waschschritten wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zur Kontrolle der Effizienz der IP wurde der Überstand nach Inkubation mit Protein A Agarose und dem ersten Zentrifugationsschritt entnommen (Ü-IP). Zur Kontrolle der Reinheit der IP wurde auch β-Aktin detektiert. +K - Zelllysat; -K – IP ohne Antikörper; IP – Immunpräzipitation; Ü – Überstand

Ein erster Versuch nach dem Protokoll des Herstellers zeigte, dass eine IP des GCRs über den anti-GCR Antikörper (Klon 5E4) zu einem positiven GCR-Signal führt. Die Reinheit (Selektivität durch den gewählten Antikörper) dieser IP wurde durch das Fehlen des β-Aktin Signals gezeigt. Jedoch war das GCR-Signal der IP sehr schwach und es konnte außerdem auch im IP-Überstand GCR Protein nachgewiesen werden.
Eine Steigerung der Effizienz der IP wurde durch Variation der Antikörperkonzentration und durch Änderung der Waschschritte angestrebt (Abb. III.21).

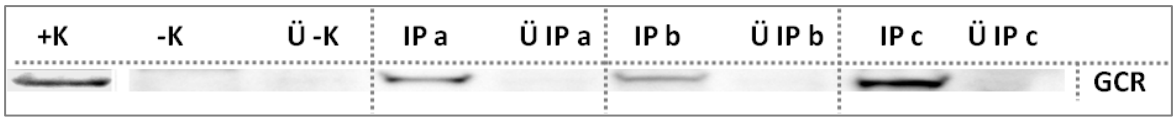

Abbildung III.21: Western Blot Analyse einer GCR-IP zur Optimierung der Effizienz der Präzipitation. Es wurden 3 unterschiedliche Konditionen (a = IP laut Protokoll der Firma Upstate; b = IP mit doppelter Antikörpermenge; c = IP laut Protokoll aber Waschschritte ohne Salzreihe) getestet. Eine Erhöhung der Antikörperkonzentration (2x) führt nicht zur Steigerung der Ausbeute an präzipitiertem Protein (IP b). Eine deutlich erhöhte Proteinmenge konnte durch Weglassen der Salzreihe während der Waschschritte erzielt werden (IP c). +K - Zelllysat; -K – IP ohne Antikörper; IP – Immunpräzipitation; Ü – Überstand

Es wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Antikörperkonzentration auf das Doppelte nicht zu einer Erhöhung der Ausbeute an GCR Protein führt (Abb. III.21; IP b). Des Weiteren erzielte die Anwendung eines optimierten Waschpuffers (0.15M NaCl; 0.05M Tris-HCl; pH8.0; 1%NP 40) eine deutlich erhöhte Ausbeute an präzipitiertem Protein (Abb. III.21; IP c) im Vergleich zur Durchführung nach Herstellerangaben (Abb. III.21; IP a). In allen entnommenen Überständen war kein GCR Protein nachweisbar.
Es wurde anhand dieser Voruntersuchungen eine definierte Antikörperkonzentration (3µg/ml) für die Folgeexperimente festgelegt, welche auch im Protokoll der Firma Upstate vorgeschlagen wird. Außerdem wurde auf die Waschschritte mit Salzreihe verzichtet, diese dafür mit dem selbst hergestellten IP Waschpuffer durchgeführt. Der Lysepuffer aus dem ChIP-Kit wurde ebenfalls ersetzt durch den selbst hergestellten IP-Lyse-Puffer (siehe Tabelle II.14; Abschnitt 2.1.7), welchem mehrere, unterschiedliche Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden, um den Abbau des Proteins durch Proteasen zu minimieren.
Unter diesen Bedingungen wurde die IP mit $4*10^7$ CD14+ Monozyten durchgeführt, also das etablierte System auf primäre humane Zellen mit Erfolg angewandt (Abb. III.22).

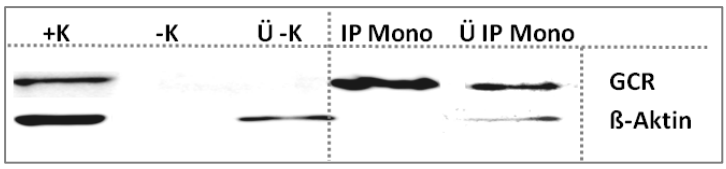

Abbildung III.22: Western Blot Analyse einer GCR-IP mit humanen CD14+ Monozyten. Nach abgeschlossener Etablierung des Immunpräzipitationssystems wurde diese Methode für CD14+ Monozyten angewandt. Es zeigte sich ein starkes GCR-Signal im IP Ansatz (IP Mono). Auch im IP Überstand (Ü IP Mono) befindet sich noch GCR Protein. Zur Kontrolle der Reinheit der IP wurde auch β-Aktin detektiert. +K - Zelllysat; -K – IP ohne Antikörper; IP – Immunpräzipitation; Ü – Überstand

Es konnte ein effizientes System für eine Immunpräzipitation mit Hilfe der Zelllinie HEK 293T entwickelt werden. Durch Variationen von Lyse- und Waschpuffer wurde die Ausbeute an präzipitiertem Protein erhöht. Die Präzipitation der GCR aus Gesamtzelllysat von humanen CD14+ Monozyten wurde ebenfalls mit dieser etablierten Methode erfolgreich durchgeführt.

3.3.2 Immunpräzipitation des mGCR

Im Vergleich zum cytosolischen Glucocorticoidrezeptor, von welchem mehrere tausend Moleküle pro Zelle vorliegen, existieren vom membranständigen Glucocorticoidrezeptor nur wenige hundert Moleküle. Dadurch ist der Nachweis des mGCRs auf der Zellmembran mittels konventioneller Färbetechniken nicht möglich, sondern erforderte stets eine Verstärkung des Signals durch Liposomentechnik [87-88].

3.3.2.1 mGCR-IP aus intakten humanen Monozyten

Um eine Präzipitation des membranständigen GCRs zu ermöglichen und eine Kontamination durch den cytosolischen Rezeptor zu vermeiden, wurde in einem initialen Experiment der folgende Ablauf (Details siehe Abschnitt 2.2.3.2.9/II) gewählt:

- CD14+ Monozyten, isoliert aus einem Buffy Coat, wurden für 24h mit LPS stimuliert um die Expression des mGCRs zu erhöhen [87].

- Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen anti-GCR Antikörper (Klon5E4).

- Nach Entfernen des überschüssigen Antikörpers wurden freie Antigenbindungsstellen mittels Antigen (*APTEK26-Peptid*) blockiert.

- Die Zellen wurden mittels Hypotonie (Resuspendieren der Zellen in ddH_2O) lysiert.

Durch diese Vorgehensweise sollte gewährleistet werden, dass der mGCR selektiv an den Antikörper gebunden wird, während der unmarkierte cGCR durch die Waschschritte entfernt wird. Unter dem Mikroskop wurde die Lyse der CD14+ Monozyten beobachtet und die Präzipitate durch Zentrifugation gewonnen. Ab diesem Schritt erfolgte die Aufreinigung der mGCR-IP so wie für die GCR-IP aus Gesamtzelllysaten weiter oben beschrieben, also die Inkubation mit der Agarose, die Waschschritte ohne Salzreihe mit anschließender Denaturierung und der Nachweis der Proteine über SDS-PAGE und Western Blot Analyse. Parallel zu der mGCR-IP mit CD14+ Monozyten wurden ebenfalls eine Gesamtzelllysat GCR-IP mit und ohne Antikörper als Kontrollen durchgeführt (Abb. III.23).

Abbildung III.23: Western Blot Analyse einer mGCR-IP mit humanen CD14+ Monozyten. Nach Etablierung der GCR-IP mittels Gesamtzelllysat wurde im nächsten Schritt eine mGCR-IP erstmalig an intakten, primären humanen CD14+ Monozyten durchgeführt. Um zu kontrollieren, ob die IP selbst effizient war, wurde parallel der GCR aus Gesamtzelllysat präzipitiert (IP GCR). Eine Präzipitation der mGCR aus humanen CD14+ Monozyten führte zu einem starken GCR-Signal (IP mGCR). Zur Kontrolle der Reinheit der IP wurde auch β-Aktin detektiert. +K - Zelllysat; -K – IP ohne Antikörper; IP – Immunpräzipitation; Ü – Überstand

Eine Analyse der Western Blots zeigte ein deutliches GCR-Signal in der mGCR-IP. Besonders auffällig dabei war jedoch, dass es sich im Vergleich zur Gesamtzelllysat GCR-IP um ein verhältnismäßig starkes GCR-Signal im mGCR-IP Ansatz handelte. Daher bestand die Vermutung, dass eine Verunreinigung durch den cGCR, z.B. während der Antikörperinkubation über Nacht, stattgefunden hat.

3.3.2.2 mGCR-IP aus einer Membranfraktion von humanen Monozyten

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurde deshalb vor der mGCR-IP eine Trennung der Membran- und der cytoplasmatischen Fraktion durchgeführt. Zum Einsatz kam das Mem-PER® (Eukaryotic Membrane Protein Extraction Kit; Pierce Protein Research) Kit, welches ermöglicht, Membranproteine aus Zellen und Geweben mittels Zentrifugation zu isolieren. Das System kann mittels hydrophoben und hydrophilen Reagenzien integrale und periphere Membranproteine von cytoplasmatischen Proteinen trennen und anreichern. Dafür wurden CD14+ Monozyten aus Buffy Coats mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und MACS Sortierung isoliert. Nach Stimulation für 24h mit LPS zur Steigerung der mGCR Expression wurden $6*10^7$ Zellen durch Zugabe von Reagenz A (Mem-PER® Kit) lysiert. Durch Zugabe eines zweiten Reagenz, gefolgt von verschiedenen Inkubations- und Zentrifugationsschritten nach den Angaben des Herstellers, kam es zu einer Phasenbildung, wobei die obere Phase die cytoplasmatischen Proteine enthält und die untere Phase die Membranfraktion darstellt. Diese Membranfraktion (MF) wurde in einem ersten Schritt gewonnen und mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse die Auftrennung der MF von der cytoplasmatischen Fraktion (CF) nachgewiesen. Als Membran-Marker diente dabei ein Pan-Cadherin Antikörper (Abb. III.24).

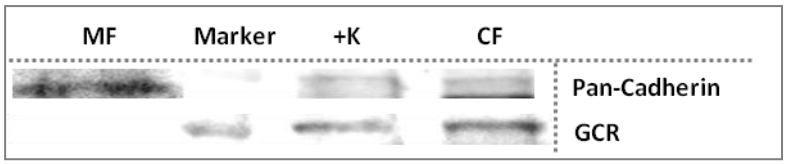

Abbildung III.24: Anreicherung membranständiger Proteine mittels Mem-PER® Kit. Zur Isolierung und Anreicherung membranständiger Proteine wurden humane CD14+ Monozyten aus einem Buffy Coat isoliert und eine Abtrennung der cytoplasmatischen Proteine nach Herstellerangaben (Pierce Protein Research) durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot wurde die Membranfraktion (MF) mittels Pan-Cadherin Antikörper nachgewiesen. Es wurde ebenfalls überprüft, ob GCR in den Fraktionen nachgewiesen werden kann. MF - Membranfraktion; CF –cytoplasmatische Fraktion; +K - Zelllysat

Mittels Mem-PER® System der Firma Pierce konnten die Membranproteine von den cytoplasmatischen Proteinen abgetrennt werden, was durch den Nachweis des Membranmarkers Pan-Cadherin gezeigt wurde. Es wurde weiterhin gezeigt, dass der humane GCR in der cytoplasmatischen Fraktion nachweisbar, jedoch nicht mittels Western Blot in der Membranfraktion detektierbar ist.

Ausgehend von diesen beiden Fraktionen, wurde gleich im Anschluss eine GCR-IP, sowohl von der Membranfraktion, der cytoplasmatischen Fraktion als auch von einem Zelllysat von Monozyten, nach dem etablierten Protokoll durchgeführt. (Abb. III.25).

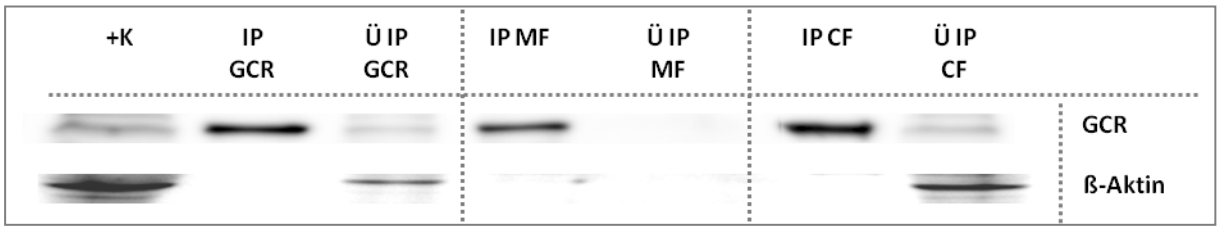

Abbildung III.25: Anreicherung membranständiger Proteine mittels Mem-PER® Kit mit anschließender GCR-IP. Zur Isolierung und Anreicherung membranständiger Proteine wurden humane CD14+ Monozyten aus einem Buffy Coat isoliert, für 24h mit LPS stimuliert und eine Abtrennung der cytoplasmatischen Proteine nach Herstellerangaben (Pierce Protein Research) durchgeführt. Im Anschluss wurde eine GCR-IP beider Fraktionen und einer Kontrolle mittels Zelllysat durchgeführt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen. Zur Kontrolle der Reinheit der IP wurde auch β-Aktin detektiert. +K - Zelllysat; MF - Membranfraktion; CF –cytoplasmatische Fraktion; IP – Immunpräzipitation; Ü – Überstand

Sowohl im Zelllysat als auch in der GCR-IP und in der IP der cytoplasmatischen Fraktion ist ein klares GCR Signal erkennbar. Eine Anreicherung der Membranproteine mittels Mem-PER® Kit hatte zur Folge, dass mittels IP der GCR erstmalig in einer Membranfraktion von humanen Monozyten nachgewiesen werden konnte.

Mit Hilfe der HEK 293T Zelllinie konnte zunächst die Effizienz der GCR-IP aus Gesamtzelllysat erhöht werden. Auch konnte dieses etablierte System in einem ersten Versuch auf primäre, humane CD14+ Monozyten erfolgreich angewandt werden. Eine mGCR-IP aus intakten humanen Monozyten zeigte ein starkes GCR Signal im Western Blot, wobei jedoch nicht ausgeschlossen werden konnte, dass eine Verunreinigung mit cytosolischen Protein aufgetreten war. Deshalb wurde vor Durchführung einer IP zunächst eine Auftrennung und Anreicherung der integralen und peripheren Membranproteine von cytoplasmatischen Proteinen mittels hydrophoben und hydrophilen Reagenzien (Mem-PER® Kit) durchgeführt. Eine anschließende IP zeigt erstmalig ein eindeutiges GCR-Signal in der Membranfraktion von CD14+ Monozyten. Das etablierte System kann als Grundlage weiterer Untersuchungen zur Herkunft des mGCR, z.B. Identifikation von Modifikationen, Anwendung finden.

3.4 Analyse der funktionellen Aktivität des humanen mGCRs

Wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.4.2), führt eine *in vitro* Stimulation zu einer gesteigerten mGCR Expression auf humanen Monozyten. Es konnte ebenfalls für Patienten mit entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. Rheumatoider Arthritis, eine erhöhte Zahl an mGCR positiven Monozyten und B-Lymphozyten im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden [87, 89, 91]. Diese Eigenschaften weisen auf eine funktionelle Aktivität des mGCRs hin, welche im folgenden Abschnitt untersucht wurde.

3.4.1 Luciferase-Reportergenassay zur Kontrolle der Reinheit von Dex-BSA

In den durchgeführten Arbeiten wurde der GCR-Ligand Dexamethason (Dex) als Standardreferenz verwendet. Hierbei handelt es sich um ein synthetisches Glucocorticoid mit hoher Bindungsaffinität und starker Wirksamkeit, welches seine Effekte hauptsächlich durch den cytosolischen Rezeptor vermittelt. Um selektive, nur durch den membranständigen GCR vermittelte Wirkungen auszulösen, wurde Dexamethason-BSA (Dexamethason (21)-Glucuronid:BSA) als Hemisuccinat verwendet, welches von der Firma Steraloids Inc. hergestellt, und von der Firma Merck aufgereinigt wurde. Diese Substanz ist durch das BSA primär membranimpermeabel, wodurch die über cytosolische Rezeptoren vermittelten Effekte nicht ausgelöst werden. Zum Ausschluss von Fehlinterpretationen musste jedoch zuerst die Reinheit des Dexamethason-BSA (Dex-BSA) bewiesen werden.
Zur Überprüfung der Reinheit, also des Anteils an unverestertem Dex in dem hier verwendeten Dex-BSA, wurde ein Luciferase-Reportergenassay durchgeführt. Dazu wurden HEK 293T Zellen mit dem pGRE-Luc Vektor transfiziert. Zellen mit einer Transfektionseffizienz ≥ 90%, ermittelt über GFP, wurden mit Dex bzw. Dex-BSA in unterschiedlicher Konzentration und über unterschiedliche Zeiträume inkubiert und anschließend die Luciferaseaktivität über die Chemilumineszenz mittels Stop&Glow am GloMax® 96 Luminometer bestimmt. Zur Normalisierung der Firefly-Luciferaseaktivität (welche Teil des pGRE-Luc Vektors ist) wurde ein Renilla-Luciferase-Expressions-Vektor (pRL) cotransfiziert und die Ratio Firefly-Luciferaseaktivität zu Renilla-Luciferaseaktivität gebildet. Die ermittelten Aktivitäten der mit Dex oder Dex-BSA behandelten Proben wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle betrachtet (Abb. III.26).

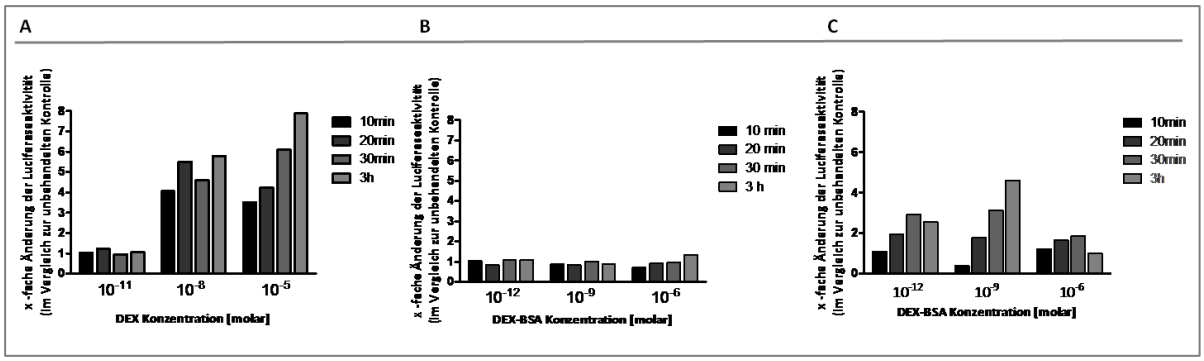

Abbildung III.26: Luciferase-Reportergenassay zur Kontrolle der Reinheit des Dex-BSA. In Abhängigkeit von Dex Konzentration und Inkubationszeit steigt die Luciferaseaktivität (A). Die Luciferaseaktivität bleibt unabhängig von der Dex-BSA Konzentration und der Inkubationszeit konstant (B), jedoch wird durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren des Dex-BSA eine gesteigerte Luciferaseaktivität gemessen (C). Eine Normalisierung der Werte wurde über die Renilla-Luciferaseaktivität durchgeführt und die Werte auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Die Abbildung zeigt je ein repräsentatives Ergebnis.

Die Auswertung zeigt für Dex erwartungsgemäß eine Konzentrations- und Inkubationszeit-abhängige Steigerung der Luciferaseaktivität (Abb. III.26A). Gezeigt wurde ein repräsentatives Beispiel für insgesamt 5 voneinander unabhängige Experimente, welche alle ein ähnliches Ergebnis zeigten. Diese wurden nicht für eine Mittelwertsbildung zusammengefasst, da die Steigerung der Luciferaseaktivität abhängig von der Transfektionseffizienz war. Es konnte eine 5-30fache Steigerung der Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt werden.

Für die Kontrolle der Reinheit des Dex-BSA wurden diese Versuche unter den gleichen Bedingungen mit Dex-BSA wiederholt (Abb. III.26B). Es wurde in insgesamt 5 unabhängigen Versuchen gezeigt, dass sich im Dex-BSA nur ein vernachlässigbar geringer Anteil an freiem Dex befand, da auch bei sehr hohen Konzentrationen nach 3h Inkubationszeit keine Änderung der Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auftrat.

Es wurde weiterhin in einem initialen Experiment analysiert, ob durch wiederholte Einfrier-/Auftauprozesse der Anteil an freiem Dex im Dex-BSA durch Dex-BSA Zerfall erhöht wurde. Wie in Abb. III.26C dargestellt, stieg in diesem Fall die Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle tatsächlich deutlich an. Dadurch konnte einerseits gezeigt werden, dass sich im Dex-BSA tatsächlich aktives Dex befand und andererseits konnte durch diese Ergebnisse in den folgenden Experimenten besonders auf die Vermeidung von Einfrier-/Auftauprozessen geachtet werden, wobei der Aufbewahrungsort selbst (Gefrierschrank mit -70°C oder -20°C (Abb.III.27A und B); Kühlschrank mit 4°C (Abb.III.27C) und Raumtemperatur bei etwa 20°C (Abb.III.27D)) keinen Einfluss auf das Dex-BSA ausübt, da keine veränderte Luciferaseaktivität ermittelt wurde.

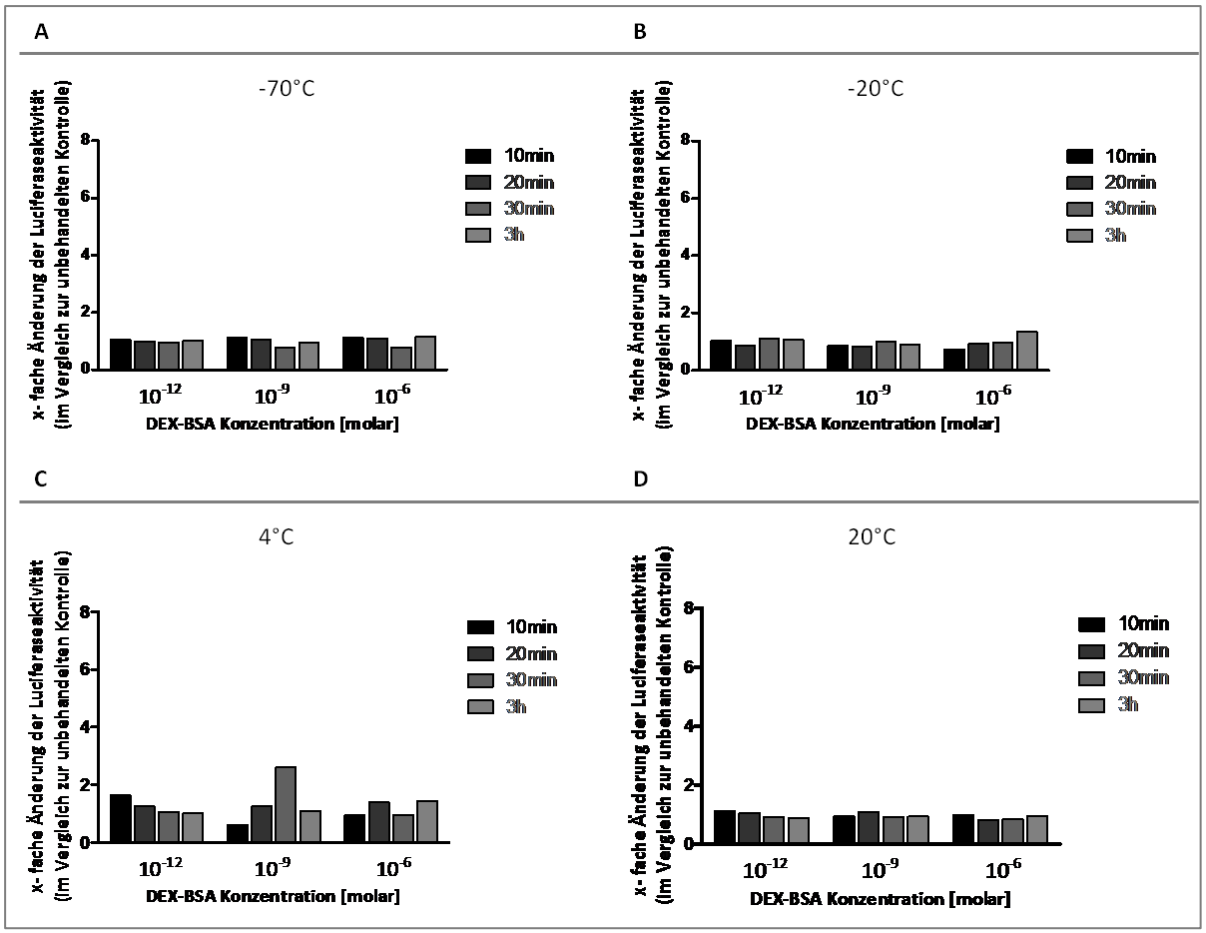

Abbildung III.27: Luciferase-Reportergenassay zur Kontrolle des Einflusses des Aufbewahrungsortes des Dex-BSA. Die Luciferaseaktivität bleibt unabhängig von der Dex-BSA Konzentration und der Inkubationszeit unter allen getesteten Aufbewahrungsbedingungen (-70°C (A); -20°C (B); 4°C (C) und Raumtemperatur bei etwa 20°C (D)) nahezu konstant. Eine Normalisierung der Werte wurde über die Renilla-Luciferaseaktivität durchgeführt und die Werte auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Die Abbildung zeigt je ein repräsentatives Ergebnis.

Anhand dieser Ergebnisse wurden sowohl die Konzentration als auch die Inkubationszeit für die folgenden Experimente gewählt. Um eine therapeutisch relevante Konzentration an Dex zu verwenden, wurde eine Konzentration von 10^{-8}M (äquimolar pharmazeutisch aktive Substanz) eingesetzt. Dex-BSA wurde in einer Konzentration von 10^{-9}M eingesetzt, da die Substanz 10 Moleküle Dex pro Molekül BSA gebunden hat. Um zu vermeiden, dass Dex-BSA durch Endozytose in das Zellinnere gelangt, intrazellulär in Dex und BSA gespalten wird und das Dex selbst doch cGCR vermittelte Effekte auslöst, wurde die Inkubationszeit auf 20min beschränkt.

3.4.2 Analyse schneller über Kinasen vermittelter Effekte

Zellen können auf externe Signale, welche an der Zellmembran ankommen, reagieren. Dabei kann ein Botenstoff an einen Membranrezeptor binden und so eine Signalkaskade auslösen. Dabei spielt die Phosphorylierung von Substraten über sogenannte Kinasen (Enzyme, welche einen Phosphatrest von z.B. ATP auf andere Substrate, oder umgekehrt, übertragen) eine wichtige Rolle. Um einen Überblick über mGCR vermittelte De-/Phosphorylierungsprozesse zu bekommen, wurde eine Analyse mittels PepChip™ Kinase Verfahren durchgeführt.

3.4.2.1 Anwendung des PepChip™ Kinase Verfahrens zur Identifizierung von Phosphorylierungsprozessen

Es wurden je $2{,}4*10^6$ CD14+ Monozyten von 5 gesunden Spendern je Kondition (LPS-Kontrolle; +Dex; +Dex-BSA) eingesetzt. Die Frequenz mGCR positiver Zellen wurde durch eine 24stündige LPS Stimulation erhöht. Die Behandlung der mGCR positiven Zellen mit der jeweiligen Substanz wurde nach Protokoll durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.3.2.11).
Bei dem PepChip™ Kinase Verfahren wurden die gewonnenen Zelllysate mit radioaktivem ^{33}-P-ATP markiert und auf den Kinase-Array gegeben. Dieser beinhaltet 1024 Peptid-Kinase-Substrate verschiedener Spezies in Triplikaten. Nach 48stündiger Inkubation mit einem Speicherphosphorschirm (*storage phosphor screen*) wurden die Spotintensitäten gemessen und ausgewertet (Details zum technischen Vorgehen sind unter http://www.pepscan.nl publiziert). In Zusammenarbeit mit dem Department of Gastroenterology and Hepatology am Leiden University Medical Center, in den Niederlanden, wurde eine erste Aufnahme und Analyse der Spotintensitäten durchgeführt (Abb. III.28).

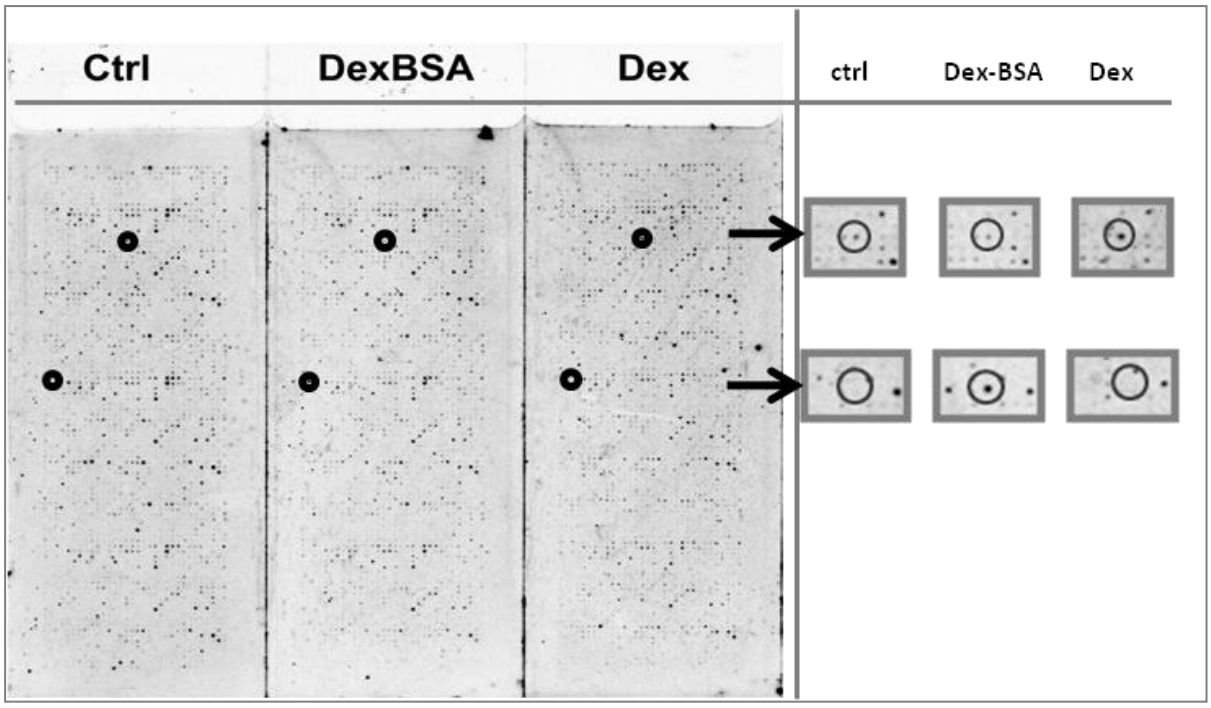

Abbildung III.28: Aufnahme der drei PepChip™-Kinase-Arrays. Messung der Kinase-Aktivität von unbehandelten, mit Dex oder mit Dex-BSA stimulierten Monozyten. Dex-BSA beeinflusst die Phosphorylierung verschiedener Kinase-Substrate, wie in den vergrößerten Beispielen rechts zu erkennen ist.

Die Spotintensitäten wurden mit dem Programm ScanAlyze (freier Download unter http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm) bestimmt und die Hintergrundstrahlung subtrahiert. Für die Analyse wurden die Spotintensitäten auf die LPS-Kontrolle normalisiert und eine statistische Analyse (two tailed t test; type one, $p < 0,05$) durchgeführt. Von den statistisch signifikanten Intensitäten wurde das Verhältnis (stimuliert/LPS-Kontrolle) des Mittelwertes aus den Dreifachbestimmungen gebildet. Das Verhältnis Dex-BSA versus LPS-Kontrolle wurde gefiltert, indem die obere Grenze bei >1,5 (d.h. 1,5-fache Steigerung der Phosphorylierung) und die untere Grenze bei <0,75 (d.h. 0,25-fache Abnahme der Phosphorylierung) gesetzt wurde. Alle Werte die sich nicht innerhalb dieser Grenzen befanden, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Anhand der Spot Nummer wurde ein Abgleich gegen signifikante, durch Dex regulierte Kinase-Substrate, durchgeführt. Bei durch beide Substanzen regulierten Substraten wurde ebenfalls das Verhältnis gebildet und wie oben beschrieben mittels Filter keine bzw. kleine Unterschiede aus den endgültigen Ergebnissen ausgegrenzt. Die so ermittelten Kinase-Substrate wurden mittels Datenbank (http://www.pantherdb.org) biologischen Prozessen zugeordnet, an denen sie beteiligt sind (Abb.III.29).

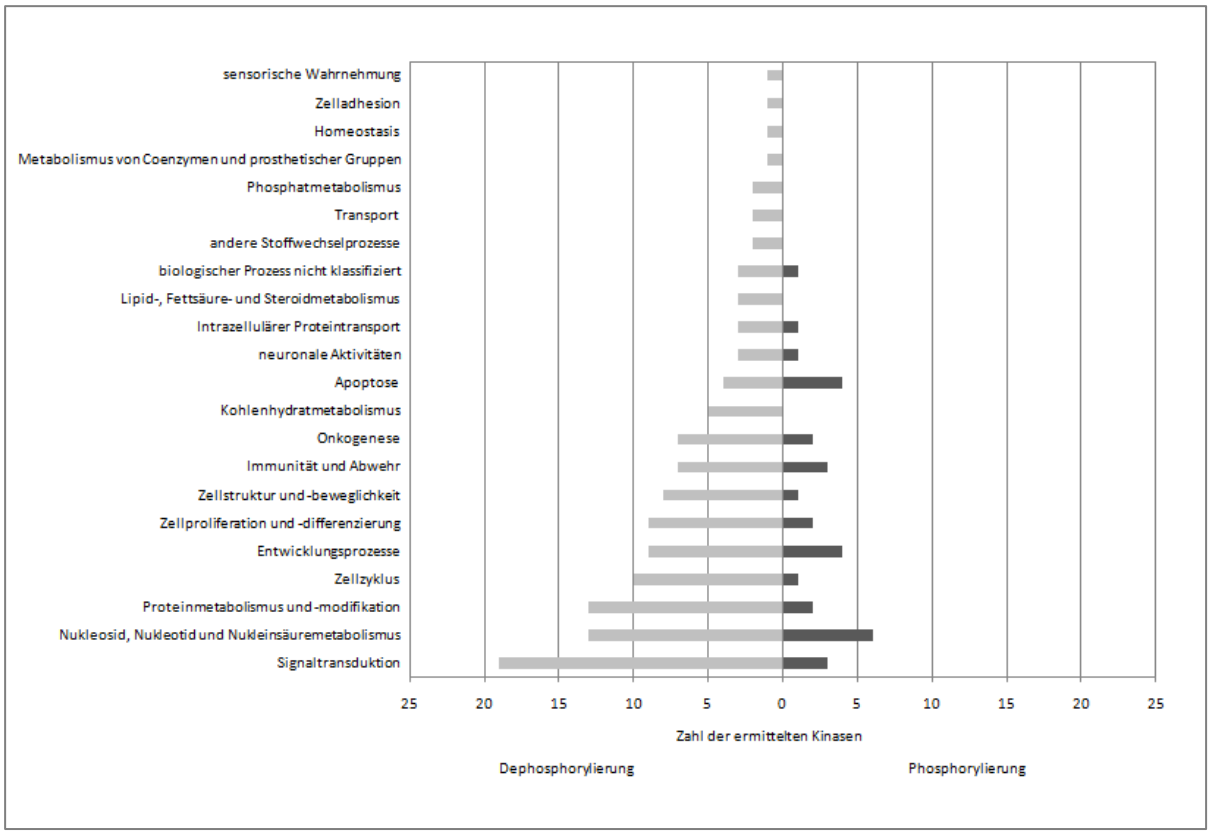

Abbildung III.29: Überblick über die durch Dex-BSA mittels Kinasen(de)phosphorylierung beeinflussten biologische Prozesse. Nach Normalisierung der im PepChip™-Kinase-Array gemessenen Spotintensitäten und Abgleich sowohl gegen die Kontrolle als auch gegen Dex konnten verschiedene Kinase-Substrate identifiziert werden, die durch Dex-BSA reguliert werden. Um nur im Vergleich zur Dex-Stimulation sehr stark unterschiedlich regulierte Kinase-Substrate aufzuzeigen, wurde eine obere und eine untere Grenze der Verhältnisse im Vergleich zur Kontrolle bei >1,5 bzw. <0,75 gesetzt. Stärker phosphorylierte Kinase-Substrate sind dunkelgrau, schwächer phosphorylierte hellgrau dargestellt.

Insgesamt wurden 41 Kinase-Substrate identifiziert, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant schwächer, und 8 Kinase-Substrate die signifikant verstärkt durch Dex-BSA Stimulation phosphoryliert wurden. Besonders stark reguliert sind vor allem die Signaltransduktion (Oberflächenrezeptor vermittelte Signaltransduktion, intrazelluläre Signalkaskade) der Nukleinsäuremetabolismus und der Proteinmetabolismus/die Proteinmodifikation. Mit Hilfe der Human Protein Reference Database (HPRD, http://www.hprd.org/) konnten nun mögliche Kinasen identifiziert werden, die für eine Phosphorylierung der jeweiligen Substrate verantwortlich sein könnten. Eine Übersicht aller signifikant, durch Dex-BSA verstärkt oder vermindert phosphorylierten Substrate und der dafür in Frage kommenden Kinasen ist in Tabelle III.5 dargestellt.

Tabelle III.5: Übersicht aller durch Dex-BSA Stimulation verstärkt oder vermindert phosphorylierten Kinase-Substrate

Spot nummer	t Test	Ratio DEX-BSA/ Kontrolle	Protein	mögliche upstream Kinase
155	0.0419	0.33	Glutamate receptor ionotropic, N-methyl D-aspartate subunit 2A	CDK5
630	0.0192	0.45	Retinoblastoma like 1	CDK4
636	0.0158	0.46	Fibroblast growth factor receptor 2	Fibroblast_growth_factor_2
709	0.0143	0.47	HIP55	ZAP70
105	0.0063	0.47	MAP2K4	AKT1
915	0.0225	0.48	Calpain, large polypeptide L1	nd
316	0.0248	0.49	N-myc	CK2 (Casein Kinase)
632	0.0357	0.50	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3A	Ribosomal_S6_kinase_1
50	0.0079	0.51	Cyclin D1	PKA
548	0.0223	0.52	CCAAT/Enhancer binding protein, beta	ERK2
370	0.0345	0.52	PCTAIRE protein kinase 1	PKA
984	0.0373	0.53	Mucin 1 transmembrane	EGFR
413	0.0036	0.55	Upstream binding factor	ERK1/2
877	0.0309	0.56	Cyclic GMP inhibited phosphodiesterase B	AKT1
999	0.0050	0.56	Lymphocyte cytosolic protein 1	PKA
532	0.0435	0.58	CAM kinase 1	Calcium-calmodulin_dependent_protein_kinase_I_kinase
1011	0.0097	0.60	Activating transcription factor 1	CK2
1022	0.0078	0.63	Solute carrier family anion exchange, member 3	PKCepsilon
881	0.0005	0.63	Nucleolar phosphoprotein p130	PKA
302	0.0321	0.64	High mobility group AT-hook 1	CK2
471	0.0240	0.64	Protein phosphatase inhibitor 2	GSK3beta;NCLK
625	0.0091	0.65	Regulator of G protein signaling 14	PKA
957	0.0479	0.65	Guanine nucleotide binding protein, alpha Z polypeptide	PKC
100	0.0263	0.65	EP4 receptor	PKA
186	0.0315	0.66	Thimet oligopeptidase 1	PKA
951	0.0487	0.66	Acetyl-CoA carboxylase alpha	CK2
1004	0.0452	0.66	5-hydroxytryptamine receptor 2C	nd
37	0.0276	0.67	Phosphoglucomutase 3	nd
873	0.0333	0.67	Androgen receptor	AKT1
109	0.0047	0.67	Forkhead box protein O3A	AKT1
809	0.0074	0.67	ABL	AKT
830	0.0365	0.67	HMG14	Ribosomal_protein_S6_kinase_alpha_3;PKA;PKC
890	0.0478	0.69	Perilipin	PKA
289	0.0123	0.69	IRS 1	nd
396	0.0495	0.72	Colony stimulating factor 1 receptor	Colony_stimulating_factor_1_receptor
261	0.0318	0.72	CDC 25B	Eg3_kinase
383	0.0015	0.72	DAB2	PKC
794	0.0173	0.72	CHK2	PKA;PKG
315	0.0349	0.72	Lamin B1	PKC
797	0.0272	0.73	Guanine nucleotide binding protein, alpha13	PKA
149	0.0490	0.75	Transcription factor 3	MAPK
13	0.0462	1.51	Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, alpha	Insulin_receptor, Lck
24	0.0419	1.78	STAT3	JAK1;c-Src
367	0.0215	1.92	Ras related C3 botulinum toxin substrate 1	AKT1
675	0.0286	2.16	Methyl CpG binding domain protein 3	Aurora_kinase_A, Serin/threonine protein kinase 6
493	0.0199	4.21	HOX B6	CK2
69	0.0208	4.24	p53	CK2alpha_1;p38_MAP_kinase;PKR;CDK2, TGF beta
852	0.0351	4.39	Bone marrow kinase BMX	c-Src, IL6, ITK Ras, Stat
920	0.0077	24.39	Antisense ERCC1	PKA RAS, NFKB, IKK, TNFalpha

Es wurden auf diesem Weg unter anderem MAP (mitogen activated protein)-Kinasen, wie beispielsweise die p38 MAP-Kinase, die Proteinkinasen A und C sowie die Casein-Kinase 2 (CK2) identifiziert. Es handelt sich hierbei nur um eine Möglichkeit der für die Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen, da die auf dem PepChip™ befindlichen Substrate durch eine Vielzahl unterschiedlicher Kinasen phosphoryliert oder dephosphoryliert werden können.

3.4.2.2 Validierung der im PepChip™ identifizierten p38 MAP-Kinase mittels Phosphoprotein Bio-Plex® und Western Blot Analyse

Eine Validierung dieser Ergebnisse fand mittels Phosphoprotein Bio-Plex® und Western Blot Analyse statt. Das Phosphoprotein Bio-Plex® Verfahren zur Bestimmung von durch Kinasen vermittelten Proteinphosphorylierungen basiert auf der Multiplex-Technologie und erlaubt den gleichzeitigen Nachweis von mehreren phosphorylierten Proteinen in einer einzelnen Probe. Zur Etablierung der Bio-Plex® Methode wurden $2*10^6$ CD4+ T-Zellen aus einem Buffy Coat isoliert und für 20min mit PMA/Ionomycin stimuliert um die Phosphorylierung im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen zu bestimmen. Es ist bekannt, dass T-Zellen unter Stimulation eine gesteigerte Phosphorylierung der ERK 1/2 MAP-Kinase ausführen. Daher wurden die Zellen laut Standardprotokoll (BioRad) lysiert, sonifiziert und der Bio-Plex® nach Vorschrift für die folgenden phosphorylierten Kinasen durchgeführt: Erk1/2; Akt1; p38; IκBα (Abb.III.30).

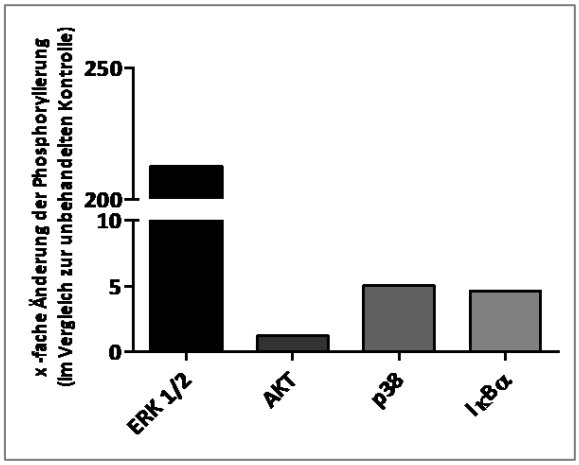

Abbildung III.30: Etablierung eines Phosphoprotein Bio-Plex® mittels Stimulation von T-Zellen. Durch Stimulation von frisch isolierten T-Zellen mit PMA/Ionomycin wurde die Phosphorylierung der Erk1/2; p38 und IκBα MAP-Kinasen induziert. Eine Normalisierung wurde auf unstimulierte T-Zellen durchgeführt.

Die Stimulation von T-Zellen mit PMA/Ionomycin zeigte für ERK1/2 eine stark induzierte (200-fach höhere Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) und für die p38 und IκBα MAP-Kinasen eine deutlich (etwa 5-fach) erhöhte Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Nach Etablierung der Methode wurde der Phosphoprotein Bio-Plex® zur Validierung der mittels PepChip™ identifizierten p38 MAP-Kinase mit humanen CD14+ Monozyten durchgeführt. Dafür wurden $4*10^6$ humane Monozyten aus Buffy Coats isoliert und der Anteil mGCR positiver Zellen durch eine 24stündige LPS Stimulation erhöht. Die Monozyten wurden für 20min mit 10^{-8}M Dex und dem entsprechend 10^{-9}M Dex-BSA bzw. BSA oder ohne Stimulans (LPS-Kontrolle) inkubiert, anschließend nach Standardprotokoll lysiert und das Nachweisverfahren gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Neben der Bestimmung der Menge eines spezifischen Phosphoproteins wurde ebenfalls der Gesamtgehalt an phosphoryliertem Protein (*Total-Target*) in einem getrennten Ansatz bestimmt. Die Messung erfolgte in einem Luminex 100 System und die Daten wurden mit der Bio-Plex® Manager 4.0 Software erhoben und analysiert (Abb. III.31A). Proteine aus Zellen, die nach dem gleichen

Schema stimuliert wurden, wurden ebenfalls mittels Western Blot aufgetrennt und mittels Immunodetektion nachgewiesen (Abb. III.31B).

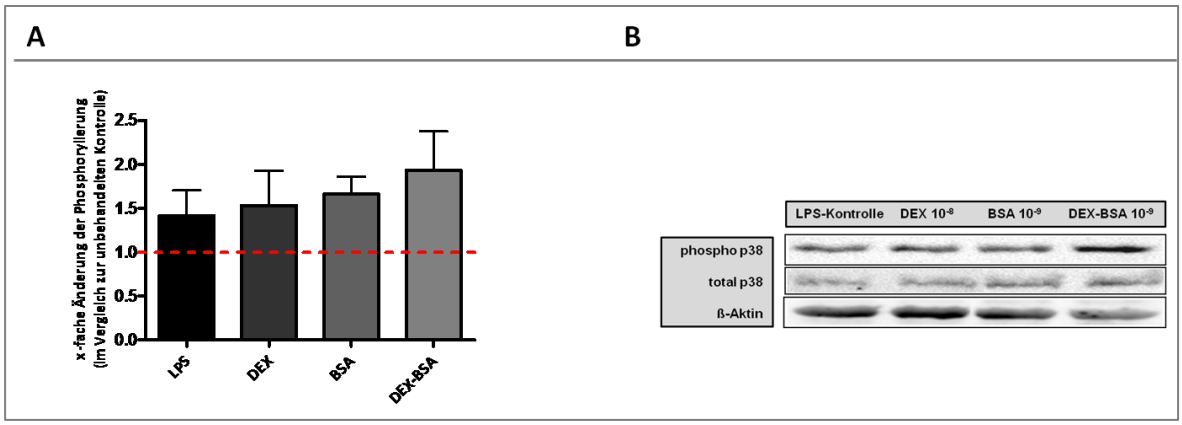

Abbildung III.31: Nachweis der mittels PepChip™ identifizierten verstärkten Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase mittels Phosphoprotein Bio-Plex® und Western Blot Analyse. Durch Stimulation von humanen Monozyten mit Dex-BSA wird die p38 MAP-Kinase im Vergleich zu den anderen Konditionen am stärksten phosphoryliert. Dieses Ergebnis ergab sich sowohl aus der Analyse von Zelllysaten mittels Phosphoprotein Bio-Plex® (A; Normalisierung der Daten auf Gesamtgehalt an phosphoryliertem Protein und auf die unbehandelte LPS-Kontrolle; n=4; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: n.s.) als auch mittels Western Blot Analyse (B; detektiert wurde auch der Gesamtgehalt an phosphoryliertem Protein (total p38) und β-Aktin).

Sowohl der Phosphoprotein Bio-Plex®, als auch die Western Blot Analyse zeigten eine durch Dex-BSA gesteigerte p38 MAP-Kinase Phosphorylierung in mGCR positiven humanen Monozyten im Vergleich zur Kontrolle, sowie zur Dex- und BSA Stimulation (n=4; Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-way ANOVA; Dunnett`s multiple comparision test: n.s.). Im Western Blot wurde dieses Ergebnis bestätigt und zusätzlich gezeigt, dass dies kein Effekt einer gesteigerten p38 MAP-Kinase Proteinexpression war.

Es wurde erstmalig mittels PepChip™-Kinase-Array gezeigt, dass durch die membranimpermeable Substanz Dex-BSA schnelle Effekte über (De)Phosphorylierungsprozesse vermittelt wurden. Allem voran hatte eine Stimulation von Monozyten mit Dex-BSA einen Einfluss auf biologische Prozesse der Signaltransduktion, was mittels Panther Datenbank gezeigt wurde. Mittels HPR Datenbank wurden einige MAP-Kinasen identifiziert, welche als mögliche Enzyme dieser Reaktionen in Frage kommen könnten. Für die p38 MAP-Kinase wurde speziell gezeigt, dass eine Stimulation mit Dex-BSA eine verstärkte Phosphorylierung des Enzyms auslöst.

3.4.3 Analyse der Effekte von Dex-BSA auf das Genexpressionsprofil

Auf Signale oder Reize von außerhalb reagieren Zellen mit dem Auslösen einer Signalkaskade. Die z.B. durch Phosphorylierungsprozesse übermittelten Signale sind für die Zellen von essentieller Bedeutung und führen zu Veränderungen der Genexpressionsmuster und damit zu Anpassungen des Stoffwechsels. Um einen Einblick auf das durch Dex-BSA veränderte Genexpressionsprofil zu bekommen, wurde eine Transkriptomanalyse mittels DNA *Microarray* durchgeführt.

3.4.3.1 Vorauswahl geeigneter Spender mittels TNFα ELISA

Um Spender, welche beispielsweise eine Infektion haben oder immunsupprimiert sind, von der DNA *Microarray* Analyse auszuschließen, wurde ein TNFα ELISA durchgeführt. Die TNFα Sekretion wird durch LPS Stimulation in humanen Monozyten gesteigert. Eine anschließende Anwendung von Dex führt zu einer Aufhebung dieses Effekts. Um Spender zu identifizieren, deren Zellen ein anderes Verhalten als das eben beschriebene aufweisen, wurden CD14+ Monozyten aus Buffy Coats isoliert und für 24h mit LPS stimuliert um die mGCR Expressionsfrequenz zu erhöhen. Anschließend wurden die Zellen mit der entsprechenden Substanz (Dex 10^{-8}M; BSA^{-9}M; Dex-BSA^{-9}M) für 20min stimuliert. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen für weitere 3h inkubiert, um eine Änderung des Genexpressionsprofils zu ermöglichen. Als Kontrollen wurden sowohl unstimulierte, als auch mit LPS stimulierte Monozyten ohne Dex, Dex-BSA oder BSA mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben in 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und zentrifugiert. Die Zellpellets, welche mittels *Microarray* analysiert werden sollten, wurden bei -80°C eingefroren, während die Zellkulturüberstände abgenommen und mittels humanTNFα ELISA nach Standardprotokoll analysiert wurden. Insgesamt wurden Monozyten von 7 Spendern isoliert, stimuliert und mittels TNFα ELISA die entnommenen Überstände analysiert. Die Absorption wurde gegen eine definierte Standardkurve in einem Platten-ELISA-Reader bestimmt und via SoftMax pro V5 Software ausgewertet (Abb. III.32).

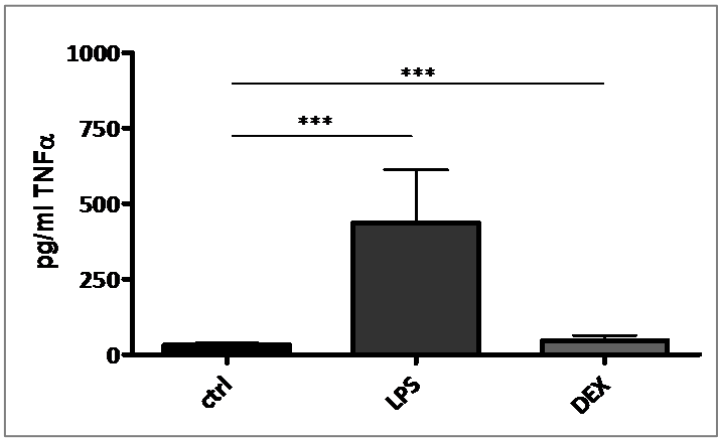

Abbildung III.32: Analyse der aus stimulierten Monozyten gewonnenen Zellkulturüberstände mittels TNFα ELISA. Die Überstände der für den *Microarray* gesammelten Proben aus insgesamt 7 Buffy Coats wurden mittels TNFα ELISA analysiert. Das typische Verhalten, d.h. ansteigender TNFα Spiegel nach LPS Stimulation und Verhinderung dessen durch Dex Behandlung; wiesen nur 5 Spender auf. (n=5; Mittellwert ± Standardabweichung des Mittelwertes; one-sample t-test: *** $p < 0.001$)

Die untersuchten Zellkulturüberstände der stimulierten Monozyten, welche von 7 Spendern gewonnen wurden, zeigten nur bei 5 Spendern das typische Verhalten auf LPS/Dex Stimulation. Die Monozyten zweier Spender reagierten nicht wie erwartet auf die Stimulation, sondern ein Ansatz zeigte bereits in der Kontrollkondition einen erhöhten Spiegel an sekretiertem TNFα während der Zweite nicht auf die LPS Stimulation reagierte. Eine Mögliche Ursache dafür könnte eine bereits vorhandene Infektion der betreffenden Spender sein. Die gewonnenen Zellpellets wurden deshalb nicht für die *Microarray* Analyse verwendet.

3.4.3.2 Analyse der Genexpression mittels *Microarray*

Aus den Zellpellets der Monozyten von 5 Spendern wurde die total RNA mittels RNeasy Kit der QIAGEN GmbH isoliert und im Bioanalyzer deren Reinheit durch die rRNA Ratio [28S / 18S] für alle Proben bestätigt. Die Proben wurden gepoolt und entweder in Cy3- oder Cy5 - markierte cDNA umgeschrieben und auf dem *Human Whole Genome Microarray* entsprechend der Herstellerangaben hybridisiert. Die Auslesung, Aufbereitung und primäre Datenanalyse wurde nach Standardprotokoll durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.3.1.7).
Es wurde eine vergleichende *Microarray*-Analyse von Kontrolle vs. LPS; Dex; Dex-BSA und BSA durchgeführt. Die detaillierte Auswertung der Daten fand mittels Microsoft Access und Excel statt. Da alle Proben für 24h mit LPS vorinkubiert wurden, konnte für alle Ansätze eine Ratio gebildet (Stimulans X vs. LPS) und wie schon bei der PepChip™ Analyse die obere Grenze bei >1,5 (d.h. 1,5 fache Steigerung der Genexpression) und die untere Grenze bei <0,75 (d.h. 0,25 fache Abnahme der Genexpression) gesetzt werden. Dadurch wurde die Zahl der durch die jeweiligen Substanzen (Dex; Dex-BSA und BSA) regulierten Gene um die Zahl der durch LPS regulierten Gene reduziert (Abb. III.33).

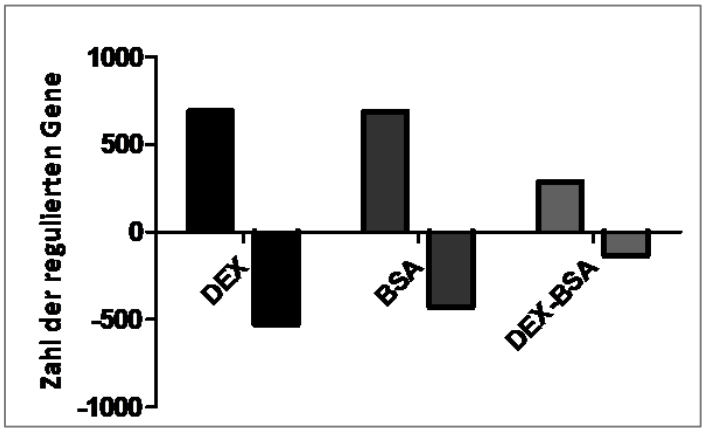

Abbildung III.33: Anzahl der durch Dex, BSA oder Dex-BSA regulierten Gene. Die Auswertung eines *Microarrays* von gepoolten Proben von 5 gesunden Spendern zeigte eine Vielzahl von regulierten Genen. Nach Ausschluss der durch LPS regulierten Gene wurden die durch Dex; Dex-BSA oder BSA ausgelösten Nettoeffekte (Stimulans X vs. LPS) der Genexpression in Monozyten bestimmt. Im positiven Bereich der x-Achse ist die Zahl der induzierten, im negativen Bereich die Zahl der reduzierten Gene aufgetragen.

Es wurde eine Vielzahl der regulierten Gene ausgeschlossen, da diese Regulation durch LPS Stimulation ausgelöst wurde, und die durch die jeweiligen Substanzen stark beeinflussten Gene wurden herausgefiltert.

Zur Validierung des *Microarrays* wurden willkürlich drei Gene ausgewählt und eine semiquantitative RT-PCR im Vergleich zu β-Aktin durchgeführt, welche den *Microarray* Daten gegenüber gestellt wurden (Abb.II.34).

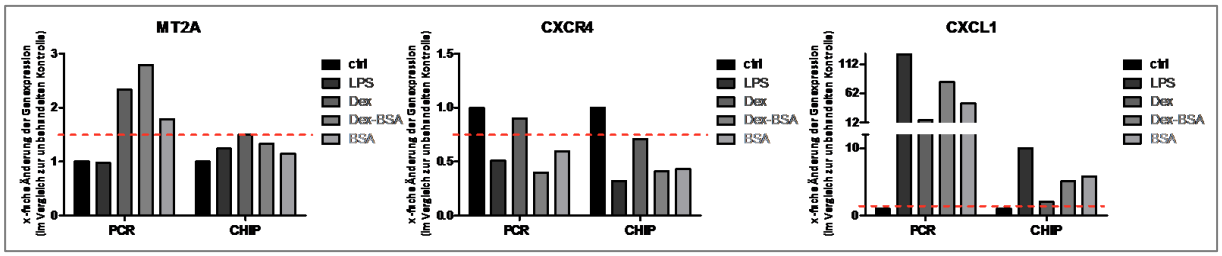

Abbildung III.34: Vergleich der für die Genexpression mittels *Microarray* ermittelten Daten mit Daten einer semiquantitativen RT-PCR. Darstellung der im *Microarray* (CHIP) und der RT-PCR (PCR) ermittelten Genexpressionsmuster in Monozyten für die Gene MT2A, CXCR4 und CXCL1. Die jeweils linke Gruppierung zeigt die mittels PCR ermittelten Daten, die jeweils rechte Gruppierung die Daten des *Microarray* (in der Abfolge: Kontrolle; LPS; Dex; Dex-BSA und BSA). Als rote Linie gekennzeichnet sind die Grenzen (>1,5 bzw. <0,75), die zur Auswertung genutzt wurden.

Nach Validierung des *Microarrays* mittels semiquantitativer RT-PCR wurden die unterschiedlich stimulierten Proben untereinander unter den gleichen Gesichtspunkten verglichen, um die verbleibenden Gene für Dex-BSA herauszufiltern, welche den extrazellulär ausgelösten Nettoeffekt des an BSA gebundenen Dexamethason darstellen (siehe Abb. II.5). Eine funktionelle Klassifizierung der Gene erfolgte über die NCBI EntrezGeneID Nomenklatur und wurde mittels Panther Klassifizierungssystem (**P**rotein **AN**alysis **TH**rough **E**volutionary **R**elationships http://www.pantherdb.org) durchgeführt. Somit wurden die Gene den biologischen Stoffwechselwegen zugeordnet, die sie beeinflussen (Abb. III.35).

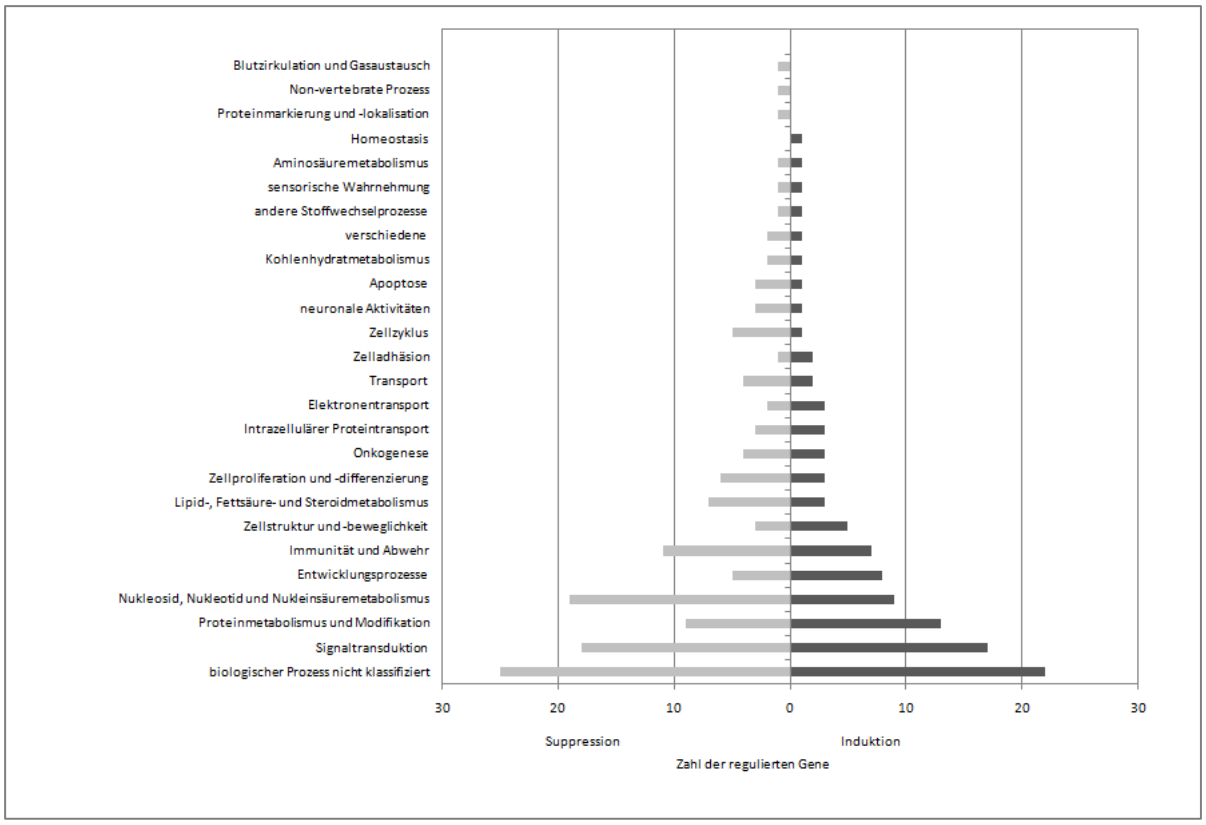

Abbildung III.35: Zuordnung der Gene aus der vergleichenden Genexpressionsanalyse zu biologischen Prozessen. Dargestellt sind alle durch Dex-BSA beeinflussten biologische Stoffwechselprozesse in humanen Monozyten. Es wurden die reinen, extrazellulären Dex-BSA Nettoeffekte durch Abgleich gegen LPS, Dex und BSA ermittelt und den biologischen Prozessen mit Hilfe der Panther Datenbank zugeordnet. In hellgrau sind Gene dargestellt, die reduziert/vermindert exprimiert wurden und in dunkelgrau sind Gene aufgezeigt, deren Expression induziert wurde.

Es wurden insgesamt 250 Gene identifiziert, deren Expression durch Stimulation mit Dex-BSA reguliert wurde. Davon war die Genexpression bei 121 Genen induziert und bei 129 Genen supprimiert. Eine Zuordnung der identifizierten Gene zu biologischen Prozessen (mittels Panther Datenbank), welche von diesen beeinflusst werden, ergab, dass besonders Gene der Signaltransduktion, des Proteinmetabolismus und der Proteinmodifikation und des Nukleinsäuremetabolismus verändert exprimiert wurden.
Im Anhang befinden sich zwei Übersichten aller, durch Dex-BSA regulierten Gene (siehe X.3/ X.4).

Durch Dex-BSA wurden neben den schnellen Effekten auch Auswirkungen auf das Genexpressionsmuster von stimulierten Monozyten ausgelöst. Eine Microarray Analyse von Dex-BSA stimulierten Zellen von geeigneten Spendern ergab eine verändert regulierte Genexpression im Vergleich zu Zellen, welche mit Dex oder BSA allein behandelt worden. Diese Gene konnten unterschiedlichen biologischen Prozessen zugeordnet werden, wobei vor allem die Signaltransduktion, der Proteinmetabolismus und die -modifikation und der Nukleinsäuremetabolismus reguliert wurden.

Diskussion

4. Diskussion

Die Glucocorticoidtherapie wird heutzutage standardmäßig zur Behandlung einer Vielzahl rheumatischer und anderer entzündlicher Erkrankungen eingesetzt, da die entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung dieser Medikamente unumstritten ist. Die Häufigkeit der Anwendung dieser Medikamente steigt von Jahr zu Jahr stetig, wobei vor allem neben der großen Effektivität auch die kostengünstige Herstellung eine große Rolle spielt. Daten aus dem Jahr 1995 zeigen, dass allein in Deutschland Glucocorticoide etwa 6,6 Millionen mal verschrieben wurden, in den USA wurden jährlich sogar etwa 10 Millionen neue Rezepte für oral verabreichte GC ausgestellt [24, 170]. Die hohe Anzahl an Verschreibungen führt zu einem geschätzten Jahresumsatz von 10 Milliarden US Dollar [24], was die bedeutende Rolle von GC im therapeutischen aber auch im wirtschaftlichen Sektor unterstreicht. Die therapeutischen Effekte von GC werden dabei über verschiedene Mechanismen vermittelt:

- Einerseits handelt es sich um den klassischen genomischen Mechanismus, welcher sich weiter einteilen lässt in die
    - Transaktivierung (wird für einen Teil der erwünschten Wirkungen, aber auch für einen Großteil der Nebenwirkungen verantwortlich gemacht) und die [23-24, 67-68]
    - Transrepression, welche eine Vielzahl der antientzündlichen und immunsuppressiven Effekte vermittelt [15, 17-18].
- Andererseits treten schnelle, so genannte nicht-genomische Effekte nach Glucocorticoidgabe auf, welche eingeteilt werden können in:
    - Effekte, welche durch den cytosolischen Glucocorticoidrezeptor (cGCR) vermittelt werden,
    - unspezifische Effekte durch Wechselwirkung der GC mit biologischen Membranen und
    - durch den membranständigen Glucocorticoidrezeptor (mGCR) vermittelte Effekte [25, 78, 80-81].

Der Wirkmechanismus der klassischen genomischen Effekte von GC, welche über den cGCR vermittelt werden, ist bereits im Detail beschrieben. Im Gegensatz dazu sind die genauen Wirkmechanismen von den schnellen, nicht-genomischen Effekten bis dato noch nicht ausreichend aufgeklärt.

Im Fokus dieser Arbeit steht der mGCR, welcher für einen Teil der schnellen, nicht-genomischen Glucocorticoideffekte verantwortlich gemacht wird [25, 78, 81]. Bisher gab es kaum Erkenntnisse über diesen Rezeptor und seine Wirkweise. In der Vergangenheit konnte lediglich gezeigt werden, dass der mGCR von humanen B-Zellen und Monozyten auf der Zellmembran exprimiert wird und dass sowohl eine Immunstimulation als auch eine erhöhte Krankheitsaktivität zu einer gesteigerten mGCR Expressionsfrequenz führen. Der mGCR spielt demzufolge wahrscheinlich eine Rolle bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. bei Rheumatoider Arthritis, ankylosierender Spondylitis oder dem systemischen Lupus erythematodes. Eine Aufklärung bzw. ein besseres Verständnis des molekularen Wirkmechanismus über den mGCR könnte zukünftig Weiterentwicklungen oder Neuentwicklungen von entzündungshemmenden Medikamenten unterstützen oder auch alternative Behandlungsmethoden von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen ermöglichen.
Aus diesem Grund standen in der hier vorgelegten Forschungsarbeit zum einen die Klärung der Herkunft des mGCRs und zum anderen die Untersuchung auf funktionelle Relevanz des Rezeptors im Vordergrund. Die Herkunft des mGCRs wurde mittels transienter und mittels stabiler Herabregulation (Knockdown) des humanen GCR-Gens in HEK 293T Zellen als Modellsystem untersucht, während die funktionelle Analyse mittels Stimulation von Monozyten mit der membranimpermeablen Substanz Dexamethason-BSA (Dex-BSA) realisiert wurde.
Die folgenden Hauptresultate wurden in den Untersuchungen gewonnen:

I) Eine kurzzeitige Herabregulation jedes einzelnen Exons des humanen GCR-Gens zeigte keine Effekte auf die mGCR Expression (siehe Abb. III.5 - III.9), indessen führte ein stabiler Knockdown des humanen GCR-Gens mittels shRNA Technologie zu einer signifikant verminderten mGCR Expression in HEK 293T Zellen siehe Abb.III.13 – III.19).

II) Die integralen und peripheren Membranproteine von humanen CD14+ Monozyten wurden mittels Mem-PER® Kit von den cytoplasmatischen Proteinen getrennt und angereichert. Nach einer anschließenden Immunpräzipitation des GCRs aus dieser Membranfraktion konnte erstmals ein mGCR Signal detektiert und somit ein direkter Nachweis des membrangebundenen Rezeptors auf humanen Immunzellen erbracht werden (siehe Abb. III.23 – III.25).

III) Mit Hilfe der membranimpermeablen Substanz Dex-BSA wurde der mGCR selektiv aktiviert (siehe Abb. III.26 – III.27). Die Signalleitung vom mGCR in das Zellinnere wird nachweislich über Phosphorylierungsprozesse vermittelt (siehe Abb. III 28 – 31), was letztlich zu einem veränderten Genexpressionsmuster in humanen CD14+ Monozyten nach Dex-BSA Stimulation führte (siehe Abb. III.32 – III. 35).

4.1 Ein Gen kodiert sowohl den cGCR als auch den mGCR

Existieren von einem Rezeptor unterschiedliche Varianten, so kann dies verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte der mGCR als eine durch posttranskriptionelle oder posttranslationale Modifikation veränderte Variante des cGCR hervorgegangen sein (*Ein-Gen-Hypothese*). Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass Norfleet *et al.* den mER mittels Antikörper nachweisen konnten, welcher den klassischen ERα detektiert [171]. Gleiches gilt auch für den mGCR: mehrere monoklonale und polyklonale Antikörper, welche den cytosolischen Rezeptor binden, konnten auch spezifisch zum Nachweis der mGCR auf der Plasmamembran verschiedener Zellen benutzt werden [85, 87, 172], was wiederum auf eine hohe Sequenzhomologie beider Rezeptorvarianten hinweist. Dies bestätigte eine Recherche in der NCBI Datenbank, welche bei einer Analyse der Aminosäuresequenz des an den Antikörper gebundenen Epitops nur einen einzigen positiven Treffer in den Proteinsequenzen ergab - den humanen Glucocorticoidrezeptor.
Bei dem mGCR scheint es sich jedoch nicht um einen unveränderten bzw. nicht modifizierten cytosolischen Rezeptor zu handeln, welcher lediglich an die Zelloberfläche transportiert wurde, da eine Überexpression des cGCRs nicht zu einer gesteigerten mGCR Expression führte [87].
Zum anderen könnten der cGCR und der mGCR von verschiedenen Genen kodiert werden (*Zwei-Gen-Hypothese*). Handelt es sich bei einer Variante um einen Rezeptor, welcher in einer Plasmamembran verankert ist, dann sollte nach der *Zwei-Gen-Hypothese* das Rezeptorprotein eine Transmembrandomäne beinhalten. Weder für die beiden verwandten membranständigen Rezeptoren (Östrogen- und Progesteronrezeptor), noch für den mGCR, wurde bis jetzt jedoch eine Transmembrandomäne innerhalb der Gensequenz beschrieben.
Wahrscheinlich ist der mGCR – und das war die 1. Arbeitshypothese - eine durch differentielles Spleißen entstandene Variante des cGCR. Durch diese *Ein-Gen-Hypothese* entsteht, ausgehend von nur einer mRNA, eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine. So könnte der mGCR durch differentielles Spleißen der neun Exons des GCR-Gens oder durch Promotor *switching* entstehen.

Um die Möglichkeit der posttranskriptionellen Modifikation zu überprüfen bzw. die *Ein-Gen-Hypothese* zu bestätigen wurde in einem Teil der Arbeit systematisch mittels RNA-Interferenz das GCR-Gen bzw. die einzelnen, aus den neun Exons hervorgehenden Spleißvarianten ausgeschaltet. Es konnte mit dieser Methode keine Spleißform identifiziert werden, welche für die Entstehung des mGCRs verantwortlich ist. Die Methode der transienten Transfektion an sich bewirkt, wie der Name schon sagt, eine vorübergehende Herabregulation des GCR-Gens. In dieser Arbeit wurde die Bestimmung der mGCR Expression immer nach 72h bzw. 96h durchgeführt. In diesem begrenzten Zeitrahmen konnte kein Einfluss eines GCR-Knockdowns auf die mGCR Expression (weder in der Frequenz mGCR positiver Zellen, noch in der Anzahl detektierbarer Oberflächenmoleküle anhand der mittleren Fluoreszenzintensität) nachgewiesen werden. Gründe dafür können

zum Einen ein sehr schneller Protein-Turnover, eine rasche Proteinneusynthese gefolgt von einem schnellen Abbau des entsprechenden Proteins, oder zum Anderen eine sehr hohe Stabilität, sprich eine lange Halbwertszeit des mGCRs sein. Jedes Protein hat seine charakteristische Halbwertszeit, welche zwischen wenigen Minuten bis hin zu Jahren liegen kann. Eine schnelle Proteinsynthese von z.B. regulatorischen Proteinen wie Leberenzymen stellt sicher, dass sich eine Zelle rasch auf veränderte Umweltbedingungen anpassen kann. Proteine, die gleichbleibende Funktionen ausüben, wie beispielsweise Proteine der Skelettmuskulatur, besitzen hingegen eine hohe Halbwertszeit.

Um auch diese Aspekte in die Knockdown Analyse mit einzubeziehen, wurden verschiedene GCR-Knockdown Zelllinien mittels vektorbasierter Technik hergestellt, also ein stabiler GCR-Knockdown erzeugt. Nach Verifizierung der Effizienz und der Funktionalität des Knockdowns wurde die mGCR Expression in diesen Zelllinien kontrolliert. Der prozentuale Anteil der mGCR positiven Zellen zeigte auch hier keinerlei Veränderung in den Knockdown Zelllinien im Vergleich zur scrambled shRNA Kontrolle. Bei der hier angewandten Methode handelte es sich aber nicht um ein Ausschalten, sprich Knockout, sondern lediglich um die Herabregulation, also einen Knockdown des GCR-Gens. Dies bedeutet, dass die einzelne Zelle an sich auch nach effizientem Knockdown immer noch wenige Moleküle des mGCR produziert und der prozentuale Anteil mGCR positiver Zellen an der Gesamtpopulation dabei konstant bleibt. Betrachtet man also die mGCR Positivität der einzelnen Zelle, so verändert diese sich nicht nach einem Knockdown des GCR-Gens. Wenn eine Veränderung der mGCR Expression stattgefunden hat, so betrifft dies nur die Anzahl der Moleküle pro Zelle. Ein solcher Effekt lässt sich bestimmen, indem man das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität als Maß für die Anzahl der mGCR-Moleküle pro Zelle betrachtet. Dieser Wert sagt aus, wie stark die Zelle selbst mGCR positiv ist, also ob beispielsweise 100 Cy5-Liposomen gebunden wurden, oder nach Knockdown nur noch 75 Cy5-Liposomen pro Zelle detektierbar waren. Alle drei der etablierten Zelllinien zeigten eine signifikant verringerte mGCR Expression pro Zelle. Eine Analyse einer möglichen Steigerung dieser Effekte durch eine zweite Transduktion mit einer unterschiedlichen shRNA zeigte eine verstärkte Herabregulation der GCR mRNA und des cGCR Proteins. Diese Mehrfach-Knockdown Zelllinien zeigten jedoch keine stärkere Herabregulation der mGCR Expression im Vergleich zu den einmalig transduzierten Knockdown Zelllinien. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es sich bei dem mGCR um ein Protein handelt, welches eine hohe Stabilität aufweist, da der Rezeptor erst durch einen stabilen Knockdown herabreguliert werden konnte.

Eine weitere mögliche Veränderung, welche das Protein auf dem Weg seiner Entstehung durchläuft, wäre eine posttranslationale Modifikation, wodurch der mGCR ebenfalls von seiner cytosolischen Variante abgeleitet worden sein könnte. Für diese Theorie spricht z.B. auch, dass der membranständige Progesteronrezeptor als Form der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (mit den typischen 7 Transmembrandomänen) identifiziert [158] und außerdem ein typisches Palmitoylierungsmotiv beschrieben wurde [145]. Insbesondere die Palmitoylierung des Cysteins 447 spielt bei dem Transport und/oder der Verankerung des

membranständigen Östrogenrezeptors eine wichtige Rolle [146]. Eine solche Modifikation, zur Ermöglichung des Einfügens der Rezeptoren in die Plasmamembran, wurde für den mGCR bis jetzt noch nicht beschrieben [87].

Um die Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation zu überprüfen, wurden mittels unterschiedlicher Inhibitoren verschiedene posttranslationale Modifikationen gehemmt. Obwohl die hier angewandten Inhibitoren für die Art der Proteinmodifikation sehr spezifisch waren, kann jedoch nicht mit Bestimmtheit geklärt werden, ob der mGCR selbst oder ein am Transport des Rezeptors beteiligtes Molekül modifiziert wurden.
Die beiden hier getesteten Inhibitoren sollten dabei das Hinzufügen der speziellen funktionellen Gruppen (Lipide oder Fettsäuren) verhindern, wodurch die Entstehung eines Lipoproteins, was aufgrund der physikochemischen Eigenschaften leicht in einer Membran verankert werden kann, gehemmt werden sollte. Vor allem die Palmitoylierung schien bei dem Transport und der Membranverankerung sowohl bei dem mER als auch dem mPR eine wichtige Rolle zu spielen [140, 145-146]. Ein solcher Effekt war jedoch bei der hier verwendeten Konzentration des Hemmstoffs 2-Fluoropalmitinsäure und der angewandten Inkubationszeit nicht zu beobachten. Alle hier durchgeführten Versuche zeigten eine unveränderte mGCR Expression, was ebenso für die Hemmung der Myristoylierung gilt. Darüber hinaus existiert eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen, welche den kleinen aber feinen Unterschied zwischen cytosolischer und membranständiger Rezeptorvariante ausmachen können. An dieser Stelle wurde stellvertretend für die Modifikationen zusätzlich die Glykosylierung überprüft, welche sich in dieser Untersuchung tatsächlich als essentiell für die Verankerung oder den Transport des mGCRs erwiesen hat.

Der Transportweg spielt bei der translationalen Modifikation eine wichtige Rolle. So zeigten Bartholome *et al*. bereits für Monozyten, dass der Transport des mGCRs zur Zellmembran mit Brefeldin A, einem Inhibitor des Transportes vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat und der Proteinsekretion, gehemmt werden kann [87]. Deshalb stellte sich auch hier die Frage, ob der Transport generell, also ebenfalls in dem Modellsystem mit HEK 293T Zellen, einen Einfluss auf die mGCR Expression hat.
Einerseits wurde der in Bartholomes Arbeit verwendete Inhibitor Brefeldin A, als auch ein Hemmstoff des intrazellulären Proteintransportes (Monensin) zur Verifizierung verwendet. Aus der deutlichen Reduktion der mGCR Expression lässt sich schließen, dass dieser Rezeptor auch in HEK 293T Zellen aktiv über das Endoplasmatischen Retikulum und den Golgi Apparat an die Membranoberfläche transportiert wird.

Die in diesem Teil der Arbeit beschriebenen Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- Sowohl der mGCR als auch der cGCR werden von nur einem Gen kodiert: dem Gen für den humanen Glucocorticoidrezeptor (*NR3C1*, nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1).

- Der humane mGCR ist keine spezielle Spleißform des cGCRs, da je ein Knockdown von drei unterschiedlichen Exons im GCR-Gen auch Effekte auf die mGCR Expression gezeigt haben.

- Der mGCR scheint also mit hoher Wahrscheinlichkeit erst durch eine posttranslationale Modifikation zu entstehen, wobei die für den mER und den mPR typische Palmitoylierung nicht als Schlüsselmodifikation nachgewiesen werden konnte.

- Der Prozess der Glykosylierung spielt eine Rolle bei der Synthese des mGCRs, wobei aber zu bestimmen bleibt, welcher Schritt mit dem Inhibitor Tunikamycin gehemmt wurde.

- Der Transport des mGCRs an die Zelloberfläche selbst konnte sowohl mit Brefeldin A, einem Inhibitor des Transportes vom Endoplasmatischem Retikulum zum Golgi Apparat und der Proteinsekretion, als auch durch Monensin, einem Hemmstoff des intrazellulären Proteintransportes blockiert werden. Es handelt sich also um einen aktiv gesteuerten Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche.

Die Ein-Gen-Hypothese zur Entstehung des mGCRs konnte in diesem Abschnitt der Arbeit erstmals bestätigt werden. Dabei scheint der mGCR trotz Knockdown in einem gewissen Maß sehr stabil auf oder in der Zellmembran verankert zu sein, da auch eine zunehmende Herabregulation des GCR-Gens nicht zu einer zunehmenden Verminderung der mGCR Expression führt. Es könnte sogar eine Stabilisierung des mGCRs stattfinden, um einen vollständigen Abbau des Proteins zu verhindern, was wiederum auf eine wichtige Rolle dieses Rezeptors für die humane Zelle hinweisen könnte. Wichtig an dieser Stelle bleiben also zum einen die Klärung der Art der Modifikation und zum anderen die Analyse des Transportprozesses, begonnen von der Bindung des Transportproteins bis hin zur Verankerung in der Zellmembran. Es konnte in dieser Arbeit zwar deutlich die Relevanz einer Glykosylierung bei der Entstehung des mGCRs bewiesen werden, aber dieser Einfluss kann auf unterschiedliche Arten zustande kommen: (i) Das mGCR Protein selbst wird glykosyliert, was bei einer Inhibition dieses Prozesses dazu führen kann, dass das Protein nicht von einem Transportprotein erkannt und deshalb nicht zur Membran transportiert und dort verankert wird. (ii) Die fehlende Glykosylierung einer bestimmten Stelle im mGCR Protein verändert die strukturellen Eigenschaften so, dass die Verankerung in der Zellmembran nicht mehr realisierbar ist, oder (iii) die Glykosylierung eines indirekt an z.B. Transport oder Verankerung beteiligtem Proteins gehemmt wurde, woraufhin der mGCR nicht mehr auf der Zelloberfläche nachweisbar wäre. Dies zu klären und weitere mögliche Modifikationen systematisch zu überprüfen sollte später im Fokus auf dieser Arbeit aufbauenden Untersuchungen liegen.

In den hier durchgeführten Arbeiten wurde die Menge an cytosolischem Rezeptor mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse bestimmt. Dabei wurde stets der monoklonale GCR Antikörper (Klon5E4) verwendet, welcher ebenso den membranständigen Rezeptor mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung auf der Plasmamembran von einigen Zellen detektiert. Deshalb stellt sich die Frage, ob der mGCR ebenfalls auf einem solchen Western Blot nachweisbar ist. Dafür sprechen würde, dass der in dieser Arbeit benutzte Antikörper beide Rezeptorvarianten sehr spezifisch detektiert. Außerdem sollte der mGCR, durch Bestätigung der *Ein-Gen-Hypothese*, in etwa die gleiche Größe wie sein cytosolischer Verwandter aufweisen. Fraglich ist jedoch, ob (i) eine posttranslationale Modifikation die Größe des mGCRs in dem Maß verändert, dass ein Unterschied mittels Western Blot Analyse sichtbar gemacht werden könnte und ob (ii) der mGCR in einem solchen Maß exprimiert wird, dass sein Signal von dem des cytosolischen Rezeptors deutlich zu unterscheiden ist.

Auf einem Immunoblot ließ sich nur ein Signal in etwa der Größe des humanen GCRs, also bei etwa 94kd, nachweisen [85], wobei die zwei aufgeworfenen Fragen bestehen bleiben: Entweder ist der mGCR nicht detektierbar weil er in zu niedrig konzentrierter Zahl anwesend ist, oder die Größen beider Rezeptoren variieren nicht in dem zur Unterscheidung benötigtem Maß. Bereits bekannt ist, dass der mGCR in viel geringerer Menge von den Zellen exprimiert wird, was sogar ein Verstärkersystem mittels Liposomen zu dessen Nachweis notwendig macht. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass selbst in einer zellulären Membranfraktion dieser Rezeptor nicht detektierbar war. Deshalb wurden erste Analysen zur Anreicherung des Rezeptors mittels Immunpräzipitation (IP) mit den folgenden Ergebnissen durchgeführt:

- Die Immunpräzipitation des GCRs aus Gesamtzelllysat wurde mit Hilfe der HEK 293T Zelllinie, welche als Modellsystem für die humanen CD14+ Monozyten Anwendung fand, etabliert. Anschließend wurde dieses System auf Monozyten übertragen und so modifiziert, dass Membranproteine der intakten Monozyten mittels Antikörper gebunden und anschließend präzipitiert wurden.

- Mittels Fraktionierung der Membranproteine und der cytoplasmatischen Proteine wurde der mGCR schon vor der Immunpräzipitation vom cGCR getrennt und die entsprechenden Proteine in der anschließenden IP positiv in humanen CD14+ Monozyten nachgewiesen.

Das System zur Isolation des mGCRs mittels IP aus intakten humanen Monozyten hatte auf große Reinheit der Methode an sich abgezielt. So wurden Waschschritte zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers oder eine Blockierung der cytosolischen Rezeptoren mittels spezifischem synthetischen Antigen angewandt. Auch die abschließende Lyse der Zellen wurde mittels ddH_2O auf milde Weise durchgeführt, um ein Lösen der Antigen-Antikörper Bindung zu verhindern. Das auf diese Weise erzielte Ergebnis zeigte ein klares und kräftiges

GCR-Signal in der mGCR-IP. Das beobachtete mGCR Signal im Immunoblot ist, verglichen mit dem beobachteten cGCR Signal, deutlich stärker als erwartet. Der cytosolische Rezeptor liegt jedoch bekanntermaßen in großem Überschuss im Vergleich zum mGCR vor (mehrere tausend Moleküle im Vergleich zu wenigen Hunderten).
Dies kann einerseits auf eine hohe Effizienz der Aufreinigung hinweisen. Es könnte jedoch auch andererseits eine Verunreinigung der mGCR-IP durch den cytosolischen Rezeptor stattgefunden haben. Dabei kommen mehrere mögliche Ursachen in Betracht: Wurde (i) der Antikörper durch die Inkubation über Nacht in die Zelle aufgenommen und konnte dort den cytosolischen Rezeptor binden? War (ii) die Blockierung der cGCR mittels spezifischen Antigens nicht ausreichend oder (iii) war die Bindungsaffinität des Antikörpers zum cytosolischen Rezeptor größer als zur membranständigen Variante, wodurch nach Lyse der Zellen die eine Bindung gelöst und die andere, bevorzugte Bindung eingegangen wurde?

Um alle drei hier genannten möglichen Ursachen für eine Verunreinigung der Membranprotein-IP von vornherein auszuschließen und die mGCR Aufreinigung zu verifizieren, wurden nicht die Proteine aus den intakten humanen Monozyten, sondern die Proteine einer Membranfraktion dieser Zellen mittels IP präzipitiert. Die Fraktionierung der cytoplasmatischen- und der Membranproteine wurde mittels Phasentrennung, also der Aufteilung der polaren (hydrophilen) und der unpolaren (lipophilen) Zellbestandteile, durchgeführt. In einer Western Blot Analyse der anschließenden IP der beiden unterschiedlichen Fraktionen konnte erstmals für humane Monozyten ein deutliches GCR-Signal in einer Membranfraktion nachgewiesen werden. Das Fehlen eines Signals für β-Aktin im Überstand der Membranfraktions-IP zeigte eine große Reinheit dieser Fraktion. Betrachtet man die Größe des auf diese Weise nachgewiesenen Rezeptors, so zeigt sich, dass dieser von seinem cytosolischen Verwandten nicht zu unterscheiden war.
Aus diesen Untersuchungen können nun folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Das Protein des membranständigen Glucocorticoidrezeptors aus humanen CD14+ Monozyten entspricht in seiner mittels Immunoblot ermittelten Größe dem Protein des cytosolischen Glucocorticoidrezeptors.

- Dadurch lässt sich bestätigen, dass für den mGCR keine Transmembrandomäne existiert, da diese im Immunoblot sichtbar wäre.

- Mittels Analyse der Größe ließ sich jedoch nicht auf eine bestimmte Art der posttranslationalen Modifikation schließen, welche eher in einer 2-D-Gelelektrophorese sichtbar wäre.

- Außerdem wird der mGCR im Vergleich zum cGCR so gering exprimiert, dass ein Nachweis des Rezeptors erst nach Anreicherung mittels Phasentrennung und Immunpräzipitation möglich war.

Wird in einem Gesamtzelllysat mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse ein Signal des humanen Glucocorticoidrezeptors in einer Größe von etwa 94kd detektiert, so handelt es sich dabei nicht ausschließlich um die cytosolische Rezeptorvariante, sondern zu einem geringen Teil auch um den membranständigen Rezeptor.
Somit ist es erstmals gelungen, den mGCR vom cGCR zu trennen und mittels IP so anzureichern, dass dieser im Immunoblot detektierbar war. Das mGCR Protein kann also erstmals als „greifbar“ bezeichnet werden, was die Tür für weitere aufschlussreiche und interessante Analyse eröffnet.

4.2 Der mGCR ist funktionell aktiv und vermittelt Signale nach Aktivierung über (De)Phosphorylierungsprozesse was wiederum eine differentielle Genexpression zur Folge hat

Der mGCR ist also eine modifizierte Variante des cGCRs, welcher auch in der Größe des Proteins in etwa mit diesem übereinstimmt. Nun stellte sich die Frage, ob der mGCR auch funktionell aktiv ist.
Für die beiden verwandten membranständigen Rezeptorvarianten, dem mER und dem mPR, wurde bereits die funktionelle Aktivität gezeigt [173-174]. So sollen schnelle Östrogensignale über den mER durch die Assoziation und Aktivierung mit/von G-Proteinen vermittelt werden [147-148]. Bisher herrscht aber Unklarheit darüber, auf welche Art die G-Proteine aktiviert werden und wie die Signalübertragung im Detail abläuft. Es konnte gezeigt werden, dass die mER-vermittelte Signalleitung sowohl zur Freisetzung von Calcium, zur Bildung von zyklischem AMP sowie zur Aktivierung verschiedener Kinasen (Src, PI3K, ERK) führt, was wiederum die Phosphorylierung von Proteinen zur Folge hat. Zudem hat diese Signalleitung einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des ERα [175]. Verschiedene Studien mit transgenen und unterschiedlichen ER Knockout Mäusen [176-177] zeigten, dass der membranständige ER für die schnelle Signalweiterleitung unabdingbar ist [178-180].
Ähnliches konnte auch für den mPR beobachtet werden. So wurde in Muskelzellen der Gebärmutter sowohl der mPRα als auch der mPRβ in Verbindung mit einem inhibitorischen G-Protein nachgewiesen. Eine Aktivierung des mPR führte zwar zur Phosphorylierung der p38 MAPK, nicht aber der p44/42 MAPK. Es scheint sogar eine Verbindung zwischen dem membranständigen und dem cytosolischem PR zu existieren, da die Aktivierung des mPR die Transaktivierung des PRs im Kern zur Folge hatte [163].
Wenn die beiden verwandten membranständigen Steroidrezeptoren eine funktionelle Aktivität aufweisen, so kann man aufgrund der bereits aufgezeigten Parallelen an dieser Stelle Gleiches für den mGCR erwarten. Wie ist es jedoch möglich, den mGCR separat zu aktivieren, ohne genomische Effekte über den cGCR auszulösen?

Ein typisches, in der Praxis oft angewandtes GC ist das Dexamethason. Um genomische GC Effekte zu verhindern, wurde diese Substanz an BSA gekoppelt, welches aufgrund seiner Größe membranimpermeabel ist. Eine ähnliche Substanz, das Östradiol-BSA wurde beispielsweise bereits angewandt um den mER zu detektieren (als Farbstoff-konjugierte Form) bzw. den mER zu aktivieren [181]. Es wurde jedoch in Frage gestellt, ob diese Substanz tatsächlich die gewünschte Reinheit aufwies oder aber stabil genug war um ausschließlich schnelle Effekte durch den mER auszulösen [182].
Bevor die Untersuchungen der funktionellen Aktivität der mGCR von humanen Monozyten durchgeführt wurden, musste deshalb zum einen die sehr hohe Reinheit des Dex-BSA, also das extrem niedrige Verhältnis von aktivem, ungebundenen Dex zu Dex-BSA gezeigt werden. Zum anderen musste ebenfalls die Stabilität, also eine fehlende Freisetzung des Dex von dem Dex-BSA Komplex nachgewiesen werden. Die Substanz Dex-BSA wurde durch diese

Untersuchungen mittels Luciferase-Reportergenassay als sehr rein und auch über einen längeren Zeitraum sehr stabil beurteilt. Es musste lediglich ein mehrmaliges Einfrieren und Auftauen vermieden werden, wodurch die Stabilität des Dex-BSA nachlässt, da sich dann Dex-Moleküle von der Substanz lösen. Für die folgenden Experimente wurde Dex in einer therapeutisch relevanten Dosis von 10^{-8}M und Dex-BSA in der korrespondierenden Konzentration (pro BSA-Molekül sind 10 Dex-Moleküle gebunden) von 10^{-9}M eingesetzt.

Die Untersuchung von mGCR-vermittelten Effekten auf das Kinom von humanen CD14+ Monozyten (mittels PepChip™ Technologie) zeigte erstmals ein unterschiedliches Phosphorylierungsmuster von Dex-BSA behandelten Monozyten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zu mit Dex bzw. BSA behandelten Monozyten. Den nach den Kriterien für die Auswertung verbleibenden, differentiell phosphorylierten Kinase-Substraten wurden die möglichen Upstream Kinasen zugeordnet, wobei eine biologische Klassifizierung (Panther Datenbank) zeigte, das die identifizierten Kinasen dabei hauptsächlich bei der Signaltransduktion beteiligt sind. Kinasen spielen bei fast allen zellulären Prozessen eine große Rolle, wobei sie aber vor allem bei der Signalleitung von extrazellulären Signalen eine Schlüsselrolle innehaben.
Wie oben bereits erläutert und in der Literatur für andere membranständige Steroidrezeptoren gezeigt, spielt die Aktivierung von MAP-Kinasen eine bedeutende Rolle, weshalb das Augenmerk hier im speziellen auf die p38 MAPK gelegt wurde. Diese Kinase ist ein wichtiger Faktor bei der Reaktion der Zelle auf Stress [183-185], wobei eine gesteigerte Phosphorylierung dieser Kinase durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden kann. So führen unterschiedliche Zytokine, Wachstumsfaktoren oder LPS durch die Phosphorylierung am Threonin180 und am Tyrosin182 zur Aktivierung der p38 MAPK [186], was wiederum die Phosphorylierung der nachgeschalteten MAPKAP Kinase 2 und unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren wie ATF-2, Stat1, Max oder MEF2 zur Folge hat [184, 186-190].
Auch für den mGCR konnte eine gesteigerte Phosphorylierung der p38 MAPK nach Stimulation mit Dex-BSA gezeigt und verifiziert werden. Dies gibt einen ersten Eindruck von dem nicht-genomischen mGCR vermittelten Mechanismus der GC Wirkung. Die Phosphorylierung der p38 MAPK muss dabei natürlich nicht der initiale Schritt zur Aktivierung einer Signalkaskade sein, sondern kann ebenso auf mehrere vorgeschaltete Phosphorylierungen von anderen Mediatoren folgen. Ein kleiner Bruchteil der Signalleitung ausgehend vom durch Dex-BSA aktivierten mGCR ins Zellinnere konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden, wobei in Zukunft detaillierter der Signalweg aufgeklärt werden muss.

Auf ein externes Signal und einer damit verbundenen schnellen Signalleitung über Kinasen folgt die Anpassung an die damit geänderten Bedingungen. So wird die Expression einiger nun verstärkt benötigter Gene/Proteine induziert, hingegen wird die Expression der Gene/Proteine, welche jetzt nicht mehr benötigt werden reduziert.
Für den genomischen Mechanismus der GC Wirkung ist der genaue Ablauf der zwei stattfindenden Prozesse, also die *Transaktivierung* und die *Transrepression,* weitestgehend aufgeklärt. Für die membranständigen Steroidhormonrezeptoren ist das Ergebnis einer

schnellen Signalweiterleitung, also die sogenannten nicht-genomischen Effekte nicht analysiert. Watson *et al.* gehen nach Studien an Lymphomzellen und Lymphozyten davon aus, dass einige zelluläre Mechanismen, die an der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt sind, von dem mGCR beeinflusst werden. Dies hat dann wiederum einen Effekt auf die Immunzellfunktion und auf klinische Parameter [191].
Die Analyse der erhobenen *Microarray* Daten (siehe Abschnitt 3.4.3.2) bestätigt diese Beobachtung. Eine Zuordnung der identifizierten Gene zeigte einen Einfluss von Dex-BSA, dem Aktivator des mGCRs, auf wichtige biologische Prozesse wie Apoptose, Zellproliferation und –differenzierung. Auch die Immunzellfunktion (Immunität und Abwehr) ist als beeinflusster biologischer Prozess in der Panther Analyse aufgeführt.
Am stärksten beeinflusst werden jedoch Gene, welche in der Zellkommunikation, also der Signaltransduktion, involviert sind. Zum einen ist die Expression von Genen der Oberflächenrezeptor-vermittelten Signaltransduktion und zum anderen der intrazellulären Signalkaskade verändert. Zu beachten ist dabei, dass eine Induktion der Genexpression der Signaltransduktion nicht zwangsläufig bedeuten muss, dass eine Aktivierung der Signalweiterleitung stattfindet. Es können auch Inhibitoren einiger Signalmoleküle oder Co-Faktoren, welche die Aktivität von Enzymen modulieren, verstärkt exprimiert werden. Der starke Einfluss auf die Expression von Genen der Signaltransduktion kann ein erster Hinweis auf einen Feedbackmechanismus, also einer positiven oder negativen Rückkopplung sein (wie in Abschnitt 1.1.1 für CRH und ACTH beschrieben). Wird über den mGCR ein Aktivierungssignal mittels Phosphorylierung von Substraten in das Zellinnere geleitet, könnten folgende Mechanismen ablaufen: Durch Aktivierung von speziellen Transkriptionsfaktoren werden

- Gene verstärkt exprimiert, die bei der Signaltransduktion beteiligt sind (z.B. Co-Rezeptoren oder Kinasen). Parallel dazu könnten Suppressoren der Signaltransduktion, also Inhibitoren oder Co-Faktoren, vermindert exprimiert werden. Infolge dessen werden Signale der Zelloberfläche schneller ins Zellinnere übertragen, es findet also eine positive Rückkopplung statt.

- Es kann aber auch eine negative Rückkopplung stattfinden, also eher Inhibitoren und andere Modulatoren, welche eine Signaltransduktion verringern, verstärkt exprimiert werden, während die Expression von Co-Rezeptoren oder von am Signalprozess beteiligten Kinasen vermindert wird.

Eine Adaptation an die damit verbundenen Änderungen kann durch einen veränderten Metabolismus oder angepasste Entwicklungsprozesse stattfinden. So wurde die Zelladhäsion durch Dex-BSA, also durch Aktivierung des mGCR beeinflusst. An dieser Stelle muss eine Beobachtung während der Herstellung der unterschiedlichen GCR-Knockdown Zelllinien beschrieben werden: Zellen, die mit Plasmiden des GCR-Knockdowns transduziert wurden, adhärierten nicht so schnell nach der Transduktion wie Zellen, die mit einem scrambled Plasmid infiziert wurden oder die Wildtyp HEK 293T Zellen selbst. Diese Beobachtung

bestätigt ebenfalls die unter 4.1 beschriebene Stabilität (ein stärkerer Knockdown-Effekt auf Genebene führte nicht zu einer gesteigerten Herabregulation des mGCR Proteins) des mGCRs, da die Zellen nach einer gewissen Zeit in etwa mit der gleichen Stärke am Gefäßboden adhärierten wie die Wildtyp- oder pLL 3.7 scr HEK 293T Zellen. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Gametchu und Watson (zusammengefasst von Watson 2001 [191]): Lymphomzellen wachsen in einer *in vitro* Zellkultur in sogenannten Clustern, also einer Anhäufung von mehreren Zellen, was durch einige Proteine der Plasmamembran, die an der Zell-Zell-Erkennung beteiligt sind, vereinfacht wird [192]. Diese Cluster treten nicht bei Zellen mit fehlender mGCR Expression auf, sollen aber durch Transfektion mit GR1A cDNA wieder erscheinen (unveröffentlichte Beobachtung) [191]. mGCR exprimierende Zellen scheinen eine Art Grenzwert für die Anzahl an mGCR auf der Oberfläche zu besitzen, bei welcher sich der Wert irgendwann einpegelt und stabil gehalten wird.

Die Analyse und Interpretation der *Microarray* Daten ermöglicht dabei noch eine Reihe von anderen möglichen Deutungen. Dabei wird aber ersichtlich, dass bei Betrachtung der beeinflussten biologischen Prozesse zwar eine Vielzahl an möglichen Effekten einer mGCR vermittelten Aktivierung aufgezeigt werden konnte, aber eine abgegrenzte Richtung/Reaktion der Zelle zu einem bestimmten Prozess dabei noch nicht identifizierbar ist. Die ermittelten Gene könnten auch anhand ihrer molekularen Funktion ausgewertet, bestimmten Proteinklassen oder konkreten Stoffwechselwegen zugeordnet werden. Allein eine Übersicht der beeinflussten Stoffwechselwege zeigt 26 Möglichkeiten auf, welche im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter analysiert wurden.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bereits ein Zusammenhang des mGCRs mit der Pathogenese von chronisch entzündlichen Erkrankungen vermutet (Vergleich Abschnitt 1.2.4.2). Durch das Aufzeigen der funktionellen Aktivität dieses Rezeptors in den hier durchgeführten Arbeiten wurde diese Vermutung noch weiter bestätigt. In zukünftigen Arbeiten sollten daher die genauen Abläufe der Signaltransduktion und die damit beeinflusste Genexpression untersucht werden, um den genauen Zusammenhang zwischen Pathogenese und Rezeptorexpression zu erklären.

4.3 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann aus den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass sowohl der mGCR als auch der cGCR von nur einem Gen kodiert werden: dem Gen für den humanen Glucocorticoidrezeptor (*NR3C1*, nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1). Des Weiteren konnte mittels RNAi Technik ausgeschlossen werden, dass es sich nicht um eine Spleißvariante des GCR-Gens handelt, wie zu Beginn der Arbeiten angenommen wurde.

Das entstandene mGCR Protein, welches in etwa in der Größe dem cGCR Protein entspricht, wird mit hoher Wahrscheinlichkeit vielmehr durch eine posttranslationale Modifikation so verändert, dass es von seinem cytosolischem Verwandten abgegrenzt werden kann. Eine mögliche Modifikation stellt dabei z.B. die in dieser Arbeit untersuchte Glykosylierung dar. Eine Inhibition dieser mittels Tunikamycin reduzierte den prozentualen Anteil an mGCR positiven Zellen. Eine mGCR-Modifikation dient wahrscheinlich sowohl der Erkennung des mGCR-Proteins durch bestimmte Transportproteine, als auch dem aktiven Transport durch das Zellplasma zur Zellmembran selbst. Dieser Transport des mGCRs zur Plasmamembran konnte in dieser Arbeit mit den beiden Hemmstoffen Brefeldin A (einem Inhibitor des Transportes vom Endoplasmatischem Retikulum zum Golgi Apparat und der Proteinsekretion) und Monensin (einem Hemmstoff des intrazellulären Proteintransportes) blockiert werden, was ebenfalls durch eine Reduktion des Anteils an mGCR positiven Zellen nachgewiesen wurde. Die eigentliche Art der Verankerung, also das Einbringen des Proteins selbst als integrales Membranprotein oder die Verbindung des mGCRs mit der Membran über einen Anker, könnte auf die gleiche posttranslationale Modifikation zurückzuführen sein.

Eine Aktivierung des mGCRs in der Zellmembran löst eine Signalkaskade aus, welche das externe Glucocorticoidsignal in das Zellinnere durch mehrere (De)Phosphorylierungsschritte von Kinasesubstraten durch verschiedene Kinasen, wie z.B. die p38 MAP Kinase, überträgt. Infolge dessen kommt es zur induzierten oder supprimierten Expression von speziellen Zielgenen, welche eine Anpassung der Zelle an die geänderten Bedingungen ermöglicht. Ein allgemeiner Überblick der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ist in Abbildung IV.1 dargestellt.

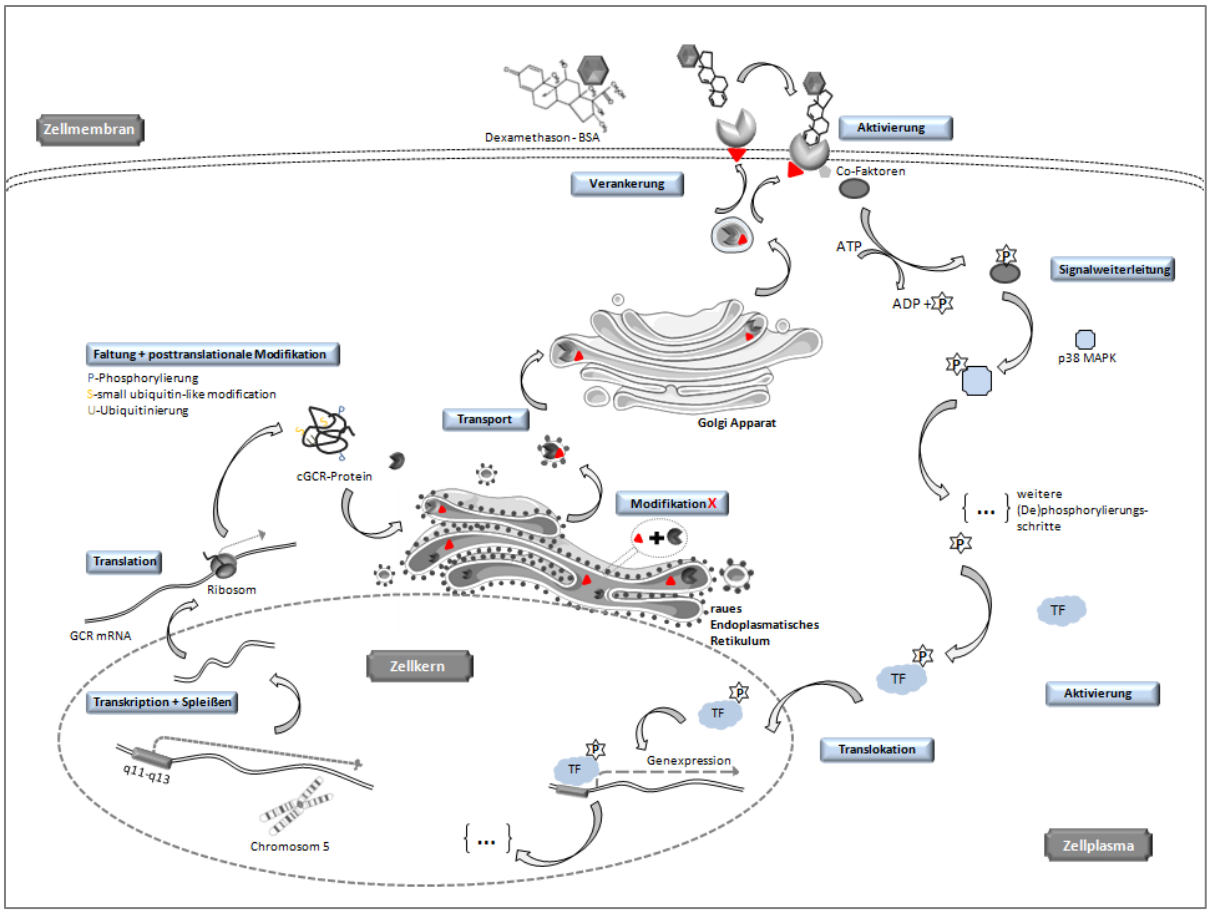

Abbildung. IV.1: Allgemeiner Überblick über Entstehung und funktionelle Aktivität des mGCR auf. Auf Chromosom 5q11-q13 befindet sich das *NR3C1* Gen, aus welchem nach Transkription und Spleißen die GCR mRNA gebildet wird. Nach Translation, Faltungsprozessen und posttranslationalen Modifikationen (z.B. Phosphorylierung, Ubiquitinierung) wird das mGCR Protein im Endoplasmatischen Retikulum weiter modifiziert (z.B. glykosyliert), zum Golgi-Apparat (wo eine Finalisierung der Modifikation stattfinden kann) und letztendlich zur Zellmembran transportiert. Dort wird das Protein entweder an die Membran angelagert oder in die Membran eingelagert. Eine Aktivierung durch z.B. Dex-BSA löst eine Signalkaskade aus, wodurch das externe Glucocorticoidsignal im Zellinneren weitergeleitet wird. Die Signalweiterleitung wird durch mehrere (De)Phosphorylierungsschritte von Kinasesubstraten durch verschiedene Kinasen, wie z.B. die p38 MAP Kinase umgesetzt. Letztendlich werden Transkriptionsfaktoren aktiviert wodurch die Expression von speziellen Zielgenen induziert oder supprimiert werden. GCR – Glucocorticoidrezeptor; TF – Transkriptionsfaktor; Endoplasmatisches Retikulum und Golgi Apparat aus SERVIER Medical Art; © 2007, Les Laboratoires SERVIER.

4.4 Ausblick

Durch diese Arbeit wurden wichtige Erkenntnisse über die Herkunft und die funktionelle Aktivität von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren erhalten. Mit jeder hier gefundenen Antwort eröffnen sich allerdings neue Fragen. Diese sollten in zukünftigen Arbeiten geklärt werden, um den Zusammenhang von mGCR Expression und verschiedenen entzündlichen Erkrankungen im Detail aufzuklären.

So wurde in dieser Arbeit erstmals die Ein-Gen-Hypothese bestätigt, also das Gen identifiziert, welches den mGCR codiert. Da es sich dabei um das humane GCR-Gen *NR3C1* handelt, muss nun im nächsten Schritt der Unterschied zwischen cytosolischem und membranständigem Rezeptor geklärt werden. Die Glykosylierung scheint an einer bestimmten Stelle eine wichtige Rolle zu spielen. Es bleibt jedoch herauszufinden, ob der mGCR selbst und wenn ja an welcher Stelle der Rezeptor glykosyliert wird. Spielt diese Modifikation eine Rolle bei dem Transport oder eher bei der Verankerung des Rezeptors in der Plasmamembran? Gibt es vielleicht weitere posttranslationale Modifikationen, welche bei diesen Prozessen eine Rolle spielen?

Weitere Fragen wirft der Transport des mGCRs durch die Zelle auf. Wie wird der mGCR erkannt und über welche Proteine wird dieser zur Plasmamembran hin transportiert? Die Art der Modifikation könnte aufbauend auf der Proteinisolation mittels Membranfraktions-GCR-IP analysiert werden, indem die Menge und Reinheit an präzipitiertem Protein optimiert wird, um eine Analyse mittels z.B. HPLC oder MALDI-TOF von diesem Protein durchzuführen.

Nicht nur die Herkunft des Rezeptors sollte im Mittelpunkt zukünftiger Analysen stehen, sondern es sollten auch die Arbeiten zur Klärung der Funktion weitergeführt werden. Nach Validierung weiterer, im PepChip™ identifizierten möglichen Kinasen, sollten die Signalwege vor und nach (also *upstream* und *downstream*) diesen Kinasen analysiert werden. Dies könnte z.B. durch Inhibition der spezifischen Upstream-Kinase realisiert werden, um den genauen Signalweg zu identifizieren. Ebenso könnte an dieser Stelle die Signalkaskade von mGCR positiven Zellen (z.B. mit LPS stimulierte humane CD14+ Monozyten) mit der Signalkaskade von mGCR schwachen Zellen (z.B. unstimulierte CD14+ Monozyten) verglichen werden. Auch eine Analyse der Genexpression im Detail, durch Auswahl spezieller Gene, welche für die Immunfunktion von Bedeutung sind, sollte in Zukunft folgen.

Trotz der zum Teil noch offenen Fragen könnte der mGCR in der Zukunft als Ziel für bestimmte Medikamente zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen in Frage kommen. Besonders interessant dabei ist natürlich die schnelle Signalweiterleitung, wodurch die beobachtete schnelle klinische Verbesserung von bestimmten Krankheitssymptomen verstärkt werden könnte. Es könnte auch durchaus sein, dass eine Medikation, abgezielt auf diese schnellen Effekte, weniger Nebenwirkungen als die konventionell verwendeten Mittel auslöst.

Referenzen

5. Referenzen

1. Henderson J. Ernest Starling and 'Hormones': an historical commentary. J Endocrinol. 2005 Jan; 184(1):5-10.
2. Voet D, Voet J. Biochemie. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1994.
3. Campbell NA. Biologie: Spektrum akademischer Verlag, 1998.
4. Tomizawa HH, Nutley ML, Narahara HT, Williams RH. The mode of inactivation of insulin by rat liver extracts. J Biol Chem. 1955 May; 214(1):285-294.
5. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys. 1958 Jun; 75(2):376-386.
6. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. J Biol Chem. 1962 Apr; 237:1375-1376.
7. Hauptmann S. Organische Chemie. Leipzig: Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH, 1991.
8. Hench PS, Kendall EC, et al. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis. Mayo Clin Proc. 1949 Apr 13; 24(8):181-197.
9. Hench PS, Slocumb CH, et al. The effects of the adrenal cortical hormone 17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone (Compound E) on the acute phase of rheumatic fever; preliminary report. Mayo Clin Proc. 1949 May 25; 24(11):277-297.
10. Reichstein T, Reich H. The chemistry of the steroids. Annu Rev Biochem. 1946; 15:155-192.
11. Hench PS. Potential Reversibility of Rheumatoid Arthritis. Ann Rheum Dis. 1949 Jun; 8(2):90-96.
12. Draper N, Stewart PM. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. J Endocrinol. 2005 Aug; 186(2):251-271.
13. Buttgereit F, Saag KG, Cutolo M, da Silva JA, Bijlsma JW. The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 2005; 34(1):14-21.
14. Buttgereit F, Burmester, G.R. Glucocorticoids. In: Klippel JH, Stone, J.H., Crofford, L.J., White, P.H., ed. *Primer on the rheumatic diseases*. 13 ed; 2007.
15. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Plaisance S, Boone E, Haegeman G. Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 11; 97(8):3919-3924.
16. Reily MM, Pantoja C, Hu X, Chinenov Y, Rogatsky I. The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. Embo J. 2006 Jan 11; 25(1):108-117.
17. Song IH, Gold R, Straub RH, Burmester GR, Buttgereit F. New glucocorticoids on the horizon: repress, don't activate! J Rheumatol. 2005 Jul; 32(7):1199-1207.
18. Nissen RM, Yamamoto KR. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. Genes Dev. 2000 Sep 15; 14(18):2314-2329.
19. Vacca A, Felli MP, Farina AR, Martinotti S, Maroder M, Screpanti I, et al. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. J Exp Med. 1992 Mar 1; 175(3):637-646.
20. Almawi WY, Melemedjian OK. Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. J Mol Endocrinol. 2002 Apr; 28(2):69-78.
21. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. Cell. 1989 Feb 10; 56(3):335-344.
22. Goulding NJ, Flower, R.J. , ed. Glucocorticoids. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag 2001.
23. Schacke H, Schottelius A, Docke WD, Strehlke P, Jaroch S, Schmees N, et al. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to

separation of therapeutic effects from side effects. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jan 6; 101(1):227-232.
24. Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. Pharmacol Ther. 2002 Oct; 96(1):23-43.
25. Stahn C, Buttgereit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. Nat Clin Pract Rheumatol. 2008 Oct; 4(10):525-533.
26. de Kloet ER. Hormones, brain and stress. Endocr Regul. 2003 Jun; 37(2):51-68.
27. Kaiser HK, H.K. Cortisontherapie - Corticoide in Klinik und Praxis. 11., neu bearbeitete Auflage ed. Stuttgard, New York: Georg Thieme Verlag, 2002.
28. Buttgereit F, Burmester GR, Lipworth BJ. Optimised glucocorticoid therapy: the sharpening of an old spear. Lancet. 2005 Feb 26-Mar 4; 365(9461):801-803.
29. Buttgereit F, da Silva JA, Boers M, Burmester GR, Cutolo M, Jacobs J, et al. Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology. Ann Rheum Dis. 2002 Aug; 61(8):718-722.
30. van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. Rheumatology (Oxford). 2000 Dec; 39(12):1383-1389.
31. Da Silva JA, Jacobs JW, Kirwan JR, Boers M, Saag KG, Ines LB, et al. Safety of low dose glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis: published evidence and prospective trial data. Ann Rheum Dis. 2006 Mar; 65(3):285-293.
32. Da Silva JA, Jacobs JW, Bijlsma JW. Revisiting the toxicity of low-dose glucocorticoids: risks and fears. Ann N Y Acad Sci. 2006 Jun; 1069:275-288.
33. Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. Arthritis Rheum. 2004 Nov; 50(11):3408-3417.
34. Bijlsma JW, Buttgereit, F., Jacobs, W.G. Systemic and intra-articular glucocorticoids in rheumatoid arthritis. In: Firestein GS, Panayi, G.S., Wollheim, F.A., ed. *Rheumatoid Arthritis*. 2 ed; 2006.
35. Thiele K, Buttgereit F, Huscher D, Zink A. Current use of glucocorticoids in patients with rheumatoid arthritis in Germany. Arthritis Rheum. 2005 Oct 15; 53(5):740-747.
36. Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Forearm bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis. J Orthop Sci. 2002; 7(5):528-534.
37. Clark LD, Bauer W, Cobb S. Preliminary observations on mental disturbances occurring in patients under therapy with cortisone and ACTH. N Engl J Med. 1952 Feb 7; 246(6):205-216.
38. Buttgereit F, Song IH, Straub RH, Burmester GR. [Current insights into the development of new glucocorticoid receptor ligands]. Z Rheumatol. 2005 Apr; 64(3):170-176.
39. Pratt WB, Morishima Y, Murphy M, Harrell M. Chaperoning of glucocorticoid receptors. Handb Exp Pharmacol. 2006(172):111-138.
40. Pratt WB. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. Proc Soc Exp Biol Med. 1998 Apr; 217(4):420-434.
41. Hutchison KA, Scherrer LC, Czar MJ, Ning Y, Sanchez ER, Leach KL, et al. FK506 binding to the 56-kilodalton immunophilin (Hsp56) in the glucocorticoid receptor heterocomplex has no effect on receptor folding or function. Biochemistry. 1993 Apr 20; 32(15):3953-3957.
42. Wikstrom AC. Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. J Endocrinol. 2003 Sep; 178(3):331-337.
43. Almawi WY, Melemedjian OK. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. J Leukoc Biol. 2002 Jan; 71(1):9-15.
44. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. Nature. 1985 Dec 19-1986 Jan 1; 318(6047):635-641.

45. Encio IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. J Biol Chem. 1991 Apr 15; 266(11):7182-7188.
46. Lu NZ, Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. Ann N Y Acad Sci. 2004 Jun; 1024:102-123.
47. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. J Biol Chem. 1996 Apr 19; 271(16):9550-9559.
48. Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. J Biol Chem. 1999 Sep 24; 274(39):27857-27866.
49. Webster JC, Jewell CM, Bodwell JE, Munck A, Sar M, Cidlowski JA. Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. J Biol Chem. 1997 Apr 4; 272(14):9287-9293.
50. Bodwell JE, Orti E, Coull JM, Pappin DJ, Smith LI, Swift F. Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. J Biol Chem. 1991 Apr 25; 266(12):7549-7555.
51. Bodwell JE, Webster JC, Jewell CM, Cidlowski JA, Hu JM, Munck A. Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. J Steroid Biochem Mol Biol. 1998 Apr; 65(1-6):91-99.
52. Ismaili N, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. Ann N Y Acad Sci. 2004 Jun; 1024:86-101.
53. Kinyamu HK, Chen J, Archer TK. Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors. J Mol Endocrinol. 2005 Apr; 34(2):281-297.
54. Le Drean Y, Mincheneau N, Le Goff P, Michel D. Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. Endocrinology. 2002 Sep; 143(9):3482-3489.
55. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? Trends Genet. 2001 Oct; 17(10):554-556.
56. Kumar R, Litwack G. Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. Steroids. 2009 Nov; 74(12):877-883.
57. Hollenberg SM, Evans RM. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. Cell. 1988 Dec 2; 55(5):899-906.
58. McEwan IJ, Wright AP, Dahlman-Wright K, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA. Direct interaction of the tau 1 transactivation domain of the human glucocorticoid receptor with the basal transcriptional machinery. Mol Cell Biol. 1993 Jan; 13(1):399-407.
59. Dahlman-Wright K, Baumann H, McEwan IJ, Almlof T, Wright AP, Gustafsson JA, et al. Structural characterization of a minimal functional transactivation domain from the human glucocorticoid receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Feb 28; 92(5):1699-1703.
60. Green S, Kumar V, Theulaz I, Wahli W, Chambon P. The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. Embo J. 1988 Oct; 7(10):3037-3044.
61. Picard D, Yamamoto KR. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. Embo J. 1987 Nov; 6(11):3333-3340.
62. Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, et al. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. Cell. 2002 Jul 12; 110(1):93-105.
63. MacGregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. Pharmacol Rev. 1998 Jun; 50(2):151-196.
64. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. Hum Reprod Update. 2000 May-Jun; 6(3):225-236.
65. Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. Mol Endocrinol. 2003 Oct; 17(10):1901-1909.
66. Muller M, Baniahmad C, Kaltschmidt C, Renkawitz R. Multiple domains of the glucocorticoid receptor involved in synergism with the CACCC box factor(s). Mol Endocrinol. 1991 Oct; 5(10):1498-1503.

67. Ishaq M, DeGray G, Mou K, Aguilera A, Yang J, Lempicki RA, et al. Zap70 signaling pathway mediates glucocorticoid receptor-dependent transcriptional activation: role in the regulation of annexin 1 expression in T cells. J Immunol. 2007 Sep 15; 179(6):3851-3858.
68. Kumar R, Thompson EB. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure:function relationship. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005 Apr; 94(5):383-394.
69. Chen R, Burke TF, Cumberland JE, Brummet M, Beck LA, Casolaro V, et al. Glucocorticoids inhibit calcium- and calcineurin-dependent activation of the human IL-4 promoter. J Immunol. 2000 Jan 15; 164(2):825-832.
70. Heck S, Bender K, Kullmann M, Gottlicher M, Herrlich P, Cato AC. I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. Embo J. 1997 Aug 1; 16(15):4698-4707.
71. Sakai DD HS, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Rottman FM, Yamamoto KR. . Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. Genes Dev 1988 Sep;2(9):1144-54. 1988.
72. Schacke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K. Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. Mol Cell Endocrinol. 2007 Sep 15; 275(1-2):109-117.
73. Lin CW, Nakane M, Stashko M, Falls D, Kuk J, Miller L, et al. trans-Activation and repression properties of the novel nonsteroid glucocorticoid receptor ligand 2,5-dihydro-9-hydroxy-10-methoxy-2,2,4-trimethyl-5-(1-methylcyclohexen-3-y 1)-1H-[1]benzopyrano[3,4-f]quinoline (A276575) and its four stereoisomers. Mol Pharmacol. 2002 Aug; 62(2):297-303.
74. Belvisi MG, Wicks SL, Battram CH, Bottoms SE, Redford JE, Woodman P, et al. Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression from transactivation activity. J Immunol. 2001 Feb 1; 166(3):1975-1982.
75. Vayssiere BM, Dupont S, Choquart A, Petit F, Garcia T, Marchandeau C, et al. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. Mol Endocrinol. 1997 Aug; 11(9):1245-1255.
76. Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. Mol Cell Endocrinol. 2007 Sep 15; 275(1-2):71-78.
77. Miner JN, Ardecky B, Benbatoul K, Griffiths K, Larson CJ, Mais DE, et al. Antiinflammatory glucocorticoid receptor ligand with reduced side effects exhibits an altered protein-protein interaction profile. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Dec 4; 104(49):19244-19249.
78. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. Steroids. 2002 May; 67(6):529-534.
79. Falkenstein E, Norman AW, Wehling M. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). J Clin Endocrinol Metab. 2000 May; 85(5):2072-2075.
80. Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. Br J Pharmacol. 2000 May; 130(2):289-298.
81. Cato AC, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. Sci STKE. 2002 Jun 25; 2002(138):RE9.
82. Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC, et al. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. Nat Med. 2002 May; 8(5):473-479.
83. Haller J, Mikics E, Makara GB. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. Front Neuroendocrinol. 2007 Oct 24.
84. Buttgereit F, Burmester GR, Brand MD. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. Immunol Today. 2000 Apr; 21(4):192-199.
85. Gametchu B, Watson CS, Wu S. Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. FASEB J. 1993 Oct; 7(13):1283-1292.

86. Orchinik M, Murray TF, Moore FL. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. Science. 1991 Jun 28; 252(5014):1848-1851.
87. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. Faseb J. 2004 Jan; 18(1):70-80.
88. Scheffold A, Miltenyi S, Radbruch A. Magnetofluorescent liposomes for increased sensitivity of immunofluorescence. Immunotechnology. 1995 Aug; 1(2):127-137.
89. Tryc AB, Spies CM, Schneider U, Kunkel D, Berki T, Sieper J, et al. Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. J Rheumatol. 2006 Nov; 33(11):2249-2253.
90. Spies CM, Schaumann DH, Berki T, Mayer K, Jakstadt M, Huscher D, et al. Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. Ann Rheum Dis. 2006 Sep; 65(9):1139-1146.
91. Spies CM, Bartholome B, Berki T, Burmester GR, Radbruch A, Scheffold A, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) on monocytes are up-regulated after vaccination. Rheumatology (Oxford). 2007 Feb; 46(2):364-365.
92. Lowenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgereit F, van Deventer S, et al. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. Blood. 2005 Sep 1; 106(5):1703-1710.
93. Lowenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, Marle J, Buttgereit F, Peppelenbosch MP, et al. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. EMBO Rep. 2006 Oct; 7(10):1023-1029.
94. Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, et al. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. Immunobiology. 2010 Jul; 215(7):521-526.
95. Cooke MP, Perlmutter RM. Expression of a novel form of the fyn proto-oncogene in hematopoietic cells. New Biol. 1989 Oct; 1(1):66-74.
96. Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. Oncogene. 2004 Oct 18; 23(48):7990-8000.
97. Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. Annu Rev Immunol. 1991; 9:679-705.
98. Zamoyska R, Basson A, Filby A, Legname G, Lovatt M, Seddon B. The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. Immunol Rev. 2003 Feb; 191:107-118.
99. Kanazawa S, Ilic D, Hashiyama M, Noumura T, Yamamoto T, Suda T, et al. p59fyn-p125FAK cooperation in development of CD4+CD8+ thymocytes. Blood. 1996 Feb 1; 87(3):865-870.
100. Rudd CE, Anderson P, Morimoto C, Streuli M, Schlossman SF. Molecular interactions, T-cell subsets and a role of the CD4/CD8:p56lck complex in human T-cell activation. Immunol Rev. 1989 Oct; 111:225-266.
101. van Oers NS, Killeen N, Weiss A. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. J Exp Med. 1996 Mar 1; 183(3):1053-1062.
102. Lowenberg M, Tuynman J, Scheffer M, Verhaar A, Vermeulen L, van Deventer S, et al. Kinome analysis reveals nongenomic glucocorticoid receptor-dependent inhibition of insulin signaling. Endocrinology. 2006 Jul; 147(7):3555-3562.
103. Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R, Strissel PL. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. Cell Mol Life Sci. 2009 Aug; 66(15):2405-2426.
104. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. Science. 1986 Mar 7; 231(4742):1150-1154.
105. Gosden JR, Middleton PG, Rout D. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24----q27 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet. 1986; 43(3-4):218-220.

106. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jun 11; 93(12):5925-5930.
107. Ward HW. Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. Br Med J. 1973 Jan 6; 1(5844):13-14.
108. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. N Engl J Med. 2003 Feb 13; 348(7):618-629.
109. Deligdisch L, Kalir T, Cohen CJ, de Latour M, Le Bouedec G, Penault-Llorca F. Endometrial histopathology in 700 patients treated with tamoxifen for breast cancer. Gynecol Oncol. 2000 Aug; 78(2):181-186.
110. Sherman MR, Corvol PL, O'Malley BW. Progesterone-binding components of chick oviduct. I. Preliminary characterization of cytoplasmic components. J Biol Chem. 1970 Nov 25; 245(22):6085-6096.
111. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. Physiol Rev. 2001 Oct; 81(4):1535-1565.
112. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. Endocrinology. 1999 Dec; 140(12):5566-5578.
113. Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. Steroids. 2003 Nov; 68(10-13):761-770.
114. Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. Mol Endocrinol. 1994 Oct; 8(10):1347-1360.
115. Roemer SC, Donham DC, Sherman L, Pon VH, Edwards DP, Churchill ME. Structure of the progesterone receptor-deoxyribonucleic acid complex: novel interactions required for binding to half-site response elements. Mol Endocrinol. 2006 Dec; 20(12):3042-3052.
116. Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. Nuclear receptor structure: implications for function. Annu Rev Physiol. 2007; 69:201-220.
117. Bolger R, Wiese TE, Ervin K, Nestich S, Checovich W. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. Environ Health Perspect. 1998 Sep; 106(9):551-557.
118. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. Cell. 1998 Dec 23; 95(7):927-937.
119. Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE. A structural biologist's view of the oestrogen receptor. J Steroid Biochem Mol Biol. 2000 Nov 30; 74(5):261-268.
120. Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 May 26; 95(11):5998-6003.
121. Williams SP, Sigler PB. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. Nature. 1998 May 28; 393(6683):392-396.
122. Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. Trends Endocrinol Metab. 2003 Apr; 14(3):124-129.
123. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, et al. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. Embo J. 2000 Sep 1; 19(17):4688-4700.
124. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Nov 4; 336(4):1023-1027.
125. Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. Novel isoforms of the mRNA for human female sex steroid hormone receptors. J Steroid Biochem Mol Biol. 2002 Dec; 83(1-5):25-30.
126. Shoda T, Hirata S, Kato J, Hoshi K. Cloning of the novel isoform of the estrogen receptor beta cDNA (ERbeta isoform M cDNA) from the human testicular cDNA library. J Steroid Biochem Mol Biol. 2002 Oct; 82(2-3):201-208.

127. Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. The novel isoform of the progesterone receptor cDNA in the human testis and detection of its mRNA in the human uterine endometrium. Oncology. 2000; 59 Suppl 1:39-44.
128. Yamanaka T, Hirata S, Shoda T, Hoshi K. Progesterone receptor mRNA variant containing novel exon insertions between exon 4 and exon 5 in human uterine endometrium. Endocr J. 2002 Aug; 49(4):473-482.
129. Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. Nat Rev Drug Discov. 2004 Jan; 3(1):27-41.
130. Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. J Biol Chem. 1990 Nov 25; 265(33):20686-20691.
131. Sabbah M, Redeuilh G, Baulieu EE. Subunit composition of the estrogen receptor. Involvement of the hormone-binding domain in the dimeric state. J Biol Chem. 1989 Feb 15; 264(5):2397-2400.
132. Sabbah M, Redeuilh G, Secco C, Baulieu EE. The binding activity of estrogen receptor to DNA and heat shock protein (Mr 90,000) is dependent on receptor-bound metal. J Biol Chem. 1987 Jun 25; 262(18):8631-8635.
133. Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, et al. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. Cell. 2005 Sep 9; 122(5):751-762.
134. O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. Mol Endocrinol. 2004 Aug; 18(8):1859-1875.
135. Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. Cell. 1990 Dec 21; 63(6):1267-1276.
136. Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, Imano E, Iwama N, Morishima T, et al. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. J Biol Chem. 1994 Jun 10; 269(23):16433-16442.
137. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. J Steroid Biochem Mol Biol. 2000 Nov 30; 74(5):311-317.
138. Pietras RJ, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. Nature. 1977 Jan 6; 265(5589):69-72.
139. Pedram A, Razandi M, Levin ER. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. Mol Endocrinol. 2006 Sep; 20(9):1996-2009.
140. Li L, Haynes MP, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 15; 100(8):4807-4812.
141. Doolan CM, Harvey BJ. A Galphas protein-coupled membrane receptor, distinct from the classical oestrogen receptor, transduces rapid effects of oestradiol on [Ca2+]i in female rat distal colon. Mol Cell Endocrinol. 2003 Jan 31; 199(1-2):87-103.
142. Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb 17; 101(7):2076-2081.
143. Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, et al. Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. Circ Res. 2000 Nov 24; 87(11):E44-52.
144. Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER. Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. Mol Cell Biol. 2003 Mar; 23(5):1633-1646.
145. Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. J Biol Chem. 2007 Aug 3; 282(31):22278-22288.
146. Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, et al. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. Mol Biol Cell. 2005 Jan; 16(1):231-237.

147. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. Mol Endocrinol. 1999 Feb; 13(2):307-319.
148. Kumar P, Wu Q, Chambliss KL, Yuhanna IS, Mumby SM, Mineo C, et al. Direct Interactions with G alpha i and G betagamma mediate nongenomic signaling by estrogen receptor alpha. Mol Endocrinol. 2007 Jun; 21(6):1370-1380.
149. Sanchez AM, Flamini MI, Zullino S, Gopal S, Genazzani AR, Simoncini T. Estrogen receptor-{alpha} promotes endothelial cell motility through focal adhesion kinase. Mol Hum Reprod. 2011 Apr; 17(4):219-226.
150. Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC. Phosphorylation of the human estrogen receptor by mitogen-activated protein kinase and casein kinase II: consequence on DNA binding. J Steroid Biochem Mol Biol. 1995 Nov; 55(2):163-172.
151. Martin MB, Franke TF, Stoica GE, Chambon P, Katzenellenbogen BS, Stoica BA, et al. A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. Endocrinology. 2000 Dec; 141(12):4503-4511.
152. Lopez GN, Turck CW, Schaufele F, Stallcup MR, Kushner PJ. Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity. J Biol Chem. 2001 Jun 22; 276(25):22177-22182.
153. Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. Mol Cell Biol. 1999 Feb; 19(2):1002-1015.
154. El-Tanani MK, Green CD. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. Mol Endocrinol. 1997 Jun; 11(7):928-937.
155. Bayaa M, Booth RA, Sheng Y, Liu XJ. The classical progesterone receptor mediates Xenopus oocyte maturation through a nongenomic mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 7; 97(23):12607-12612.
156. Faivre E, Skildum A, Pierson-Mullany L, Lange CA. Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. Steroids. 2005 May-Jun; 70(5-7):418-426.
157. Tian J, Kim S, Heilig E, Ruderman JV. Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for Xenopus oocyte activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 19; 97(26):14358-14363.
158. Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 4; 100(5):2237-2242.
159. Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Thomas P, Trant JM. Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progestin receptors and their tissue-distribution in channel catfish, Ictalurus punctatus. J Mol Endocrinol. 2005 Jun; 34(3):781-791.
160. Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Trant JM. Membrane-bound progestin receptors in channel catfish and zebrafish ovary: changes in gene expression associated with the reproductive cycles and hormonal reagents. Gen Comp Endocrinol. 2005 May 15; 142(1-2):204-211.
161. Dressing GE, Thomas P. Identification of membrane progestin receptors in human breast cancer cell lines and biopsies and their potential involvement in breast cancer. Steroids. 2007 Feb; 72(2):111-116.
162. Neubauer H, Yang Y, Seeger H, Fehm T, Cahill MA, Tong X, et al. The presence of a membrane-bound progesterone receptor sensitizes the estradiol-induced effect on the proliferation of human breast cancer cells. Menopause. 2011 Aug; 18(8):845-850.
163. Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhouse EW, Randeva HS, et al. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. Mol Endocrinol. 2006 Jul; 20(7):1519-1534.
164. Hanna R, Pang Y, Thomas P, Zhu Y. Cell-surface expression, progestin binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progestin receptors alpha and beta in transfected cells. J Endocrinol. 2006 Aug; 190(2):247-260.

165. Nutu M, Weijdegard B, Thomas P, Bergh C, Thurin-Kjellberg A, Pang Y, et al. Membrane progesterone receptor gamma: tissue distribution and expression in ciliated cells in the fallopian tube. Mol Reprod Dev. 2007 Jul; 74(7):843-850.
166. Berki T, Kumanovics G, Kumanovics A, Falus A, Ujhelyi E, Nemeth P. Production and flow cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. J Immunol Methods. 1998 May 1; 214(1-2):19-27.
167. Pelham HR. Multiple targets for brefeldin A. Cell. 1991 Nov 1; 67(3):449-451.
168. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. Nat Genet. 2003 Mar; 33(3):401-406.
169. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science. 2002 Apr 19; 296(5567):550-553.
170. Schwabe. Corticosteroide. In: Schwabe P, ed. *Arzneiverordnungs-Report 1996*. Stuttgart: Fischer; 1996:184-188.
171. Norfleet AM, Thomas ML, Gametchu B, Watson CS. Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. Endocrinology. 1999 Aug; 140(8):3805-3814.
172. Powell CE, Watson CS, Gametchu B. Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. Endocrine. 1999 Jun; 10(3):271-280.
173. Skildum A, Faivre E, Lange CA. Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. Mol Endocrinol. 2005 Feb; 19(2):327-339.
174. Acconcia F, Marino M. The Effects of 17beta-estradiol in Cancer are Mediated by Estrogen Receptor Signaling at the Plasma Membrane. Front Physiol. 2011; 2:30.
175. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol Endocrinol. 2005 Apr; 19(4):833-842.
176. Pedram A, Razandi M, Kim JK, O'Mahony F, Lee EY, Luderer U, et al. Developmental phenotype of a membrane only estrogen receptor alpha (MOER) mouse. J Biol Chem. 2009 Feb 6; 284(6):3488-3495.
177. Pedram A, Razandi M, Evinger AJ, Lee E, Levin ER. Estrogen inhibits ATR signaling to cell cycle checkpoints and DNA repair. Mol Biol Cell. 2009 Jul; 20(14):3374-3389.
178. Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors. Trends Endocrinol Metab. 2009 Dec; 20(10):477-482.
179. Levin ER. Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions. J Physiol. 2009 Nov 1; 587(Pt 21):5019-5023.
180. Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. Mol Cell Endocrinol. 2011 Jun 28.
181. Stevis PE, Deecher DC, Suhadolnik L, Mallis LM, Frail DE. Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. Endocrinology. 1999 Nov; 140(11):5455-5458.
182. Binder M. Oestradiol-BSA conjugates for receptor histochemistry: problems of stability and interactions with cytosol. Histochem J. 1984 Sep; 16(9):1003-1023.
183. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. Cell. 1994 Sep 23; 78(6):1027-1037.
184. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. Nature. 1994 Dec 22-29; 372(6508):739-746.
185. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, et al. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. Cell. 1994 Sep 23; 78(6):1039-1049.

186. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. J Biol Chem. 1995 Mar 31; 270(13):7420-7426.
187. Zervos AS, Faccio L, Gatto JP, Kyriakis JM, Brent R. Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Nov 7; 92(23):10531-10534.
188. Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, di Padova F, et al. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. Mol Cell Biol. 1999 Jan; 19(1):21-30.
189. Yang SH, Galanis A, Sharrocks AD. Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors. Mol Cell Biol. 1999 Jun; 19(6):4028-4038.
190. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell. 1995 Jul 28; 82(2):241-250.
191. Watson CS, Gametchu B. Membrane estrogen and glucocorticoid receptors--implications for hormonal control of immune function and autoimmunity. Int Immunopharmacol. 2001 Jun; 1(6):1049-1063.
192. Mourad W, Geha RS, Chatila T. Engagement of major histocompatibility complex class II molecules induces sustained, lymphocyte function-associated molecule 1-dependent cell adhesion. J Exp Med. 1990 Nov 1; 172(5):1513-1516.

6. Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank.
Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Buttgereit für die ausgezeichnete Betreuung bedanken. Sie haben mir die Möglichkeit gegeben, dieses spannende Thema zu bearbeiten und waren bereit, mich zu unterstützen, zu motivieren und viele Fakten auch kontrovers zu diskutieren.
Ich danke Herrn Prof. Lauster herzlich für seine Bereitschaft, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Timo Gaber für die fundierte Unterstützung und den ständigen Zuspruch während meiner Doktorarbeit bedanken, der nicht nur Dank seines Fachwissens stets gute Ratschläge und besondere Ideen für mich bereithielt, sondern auch auf menschlicher Ebene stets für Motivation sorgte.

Außerdem danke ich Manuela Jakstadt für ihre ständige Hilfsbereitschaft, die praktische Einarbeitung in die Methoden, die Tricks und Kniffe bei der Anwendung ebendieser Methoden und ganz besonders für die freundliche und liebenswerte Arbeitsatmosphäre.

Für die ständige Hilfsbereitschaft, die fachkundige und motivierende Unterstützung, für die unzähligen anregenden wissenschaftlichen und nicht ganz so ernsten Diskussionen sowie für die konstruktive Kritik und natürlich das freundschaftliche Arbeitsklima möchte ich ein großes Dankeschön an meine Kollegen Saskia Schellmann, Paula Hoff, Martin Hahne, Markus Wagegg, Monique Fangradt, Cornelia M. Spies, Natalia Soboleva, René Dziurla, Karolina Tykwinska, Patrick Maschmeyer, Ferenz L. Lohanatha, Cam Loan Tran und Steffi Lüttkecosmann aussprechen.

Der AG Riemekasten danke ich für die freundliche Atmosphäre die, trotz sehr beengter Arbeitsverhältnisse bis zum Schluss erhalten blieb.
Luzie Reiners-Schramm und Agnes Schumacher der ehemaligen DRFZ Liasongruppe Lauster möcht ich ebenfalls für die praktische Unterstützung danken.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Mann, die mich in allen Lebenslagen uneingeschränkt unterstützt haben.

7. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die von mir vorgelegte Dissertation mit dem Titel „**Analyse der Herkunft und funktioneller Aktivität humaner membranständiger Glucocorticoidrezeptoren“** zur Erlangung des akademischen Grades Doktor *rerum naturalium* (abgek. Dr. *rer. nat.*) in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Cindy Strehl

8. Lebenslauf/Curriculum Vitae

Persönliche Daten / Informationen

Name	Strehl
Vorname	Cindy
Geburtsname	Stahn
Geburtsdatum	24.12.1979
Geburtsort	Mittweida
Familienstand	verheiratet

Schulausbildung

1986 – 1987	Julius-Fučik-Grundschule (Hartha/Sachsen)
1987 – 1992	Otto-Grotewohl-Grundschule (Hartha/Sachsen)
1992 - 1998	Martin-Luther-Gymnasium (Hartha/Sachsen)
	Abitur, Abschluss: gut

Berufsausbildung

09/98-07/00	Ausbildung zur Umweltschutztechnischen Assistentin (UTA)
	Berufliches Schulzentrum in Reichenbach/Sachsen
	staatlich geprüfte UTA, Abschluss: sehr gut

Studium

10/00-02/06	Studium der Biochemie an der Universität Leipzig
	Diplom Biochemikerin – Abschluss: gut
Projektarbeit:	Gewinnung zellfreier P450non-Nd-His_6 Präparate

Diplomarbeit:	„Überprüfung eines Modellsystems zur Expression verschiedener *cyp153A1*-Gen-Varianten aus *Escherichia coli* XL1-Blue in alk$^-$-Mutanten alkanverwertender *Pseudomonaden*“
24.10.2011	Promotion (Tag der wissenschaftlichen Aussprache) an der Technischen Universität Berlin
Dissertationsthema:	„Analyse der Herkunft und funktioneller Aktivität humaner membranständiger Glucocorticoidrezeptoren“

wissenschaftliche Mitarbeit

seit 01/07	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Charité Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie, AG Prof. Dr. Frank Buttgereit

9. Eigene Publikationen im Rahmen dieser Arbeit

Veröffentlichungen von irgendwelchen Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir wie folgt vorgenommen worden.

Publikationen

1. Strehl C, Gaber T., Löwenberg M., Hommes D.W., Verhaar A.P., Schellmann S., Hahne M., Fangradt M., Wagegg M., Hoff P., Scheffold A., Spies C.M., Burmester G.R., Buttgereit F. Membrane-bound glucocorticoid receptors. Origin and functional activity of the membrane-bound glucocorticoid receptor; Arthritis & Rheum. 2011 (in press)

2. Gaber T, Schellmann S, Erekul KB, Fangradt M, Tykwinska K, Hahne M, Maschmeyer P, Wagegg M, Stahn C, Kolar P, Dziurla R, Löhning M, Burmester GR, Buttgereit F. Macrophage Migration Inhibitory Factor Counterregulates Dexamethasone-Mediated Suppression of Hypoxia-Inducible Factor-1{alpha} Function and Differentially Influences Human CD4+ T Cell Proliferation under Hypoxia. J Immunol. 2011 Jan 15;186(2):764-74. Epub 2010 Dec 17. PMID: 21169549

3. Spies CM, Gaber T, Hahne M, Naumann L, Tripmacher R, Schellmann S, Stahn C, Burmester GR, Radbruch A, Buttgereit F. Rimexolone inhibits proliferation, cytokine expression and signal transduction of human CD4+ T-cells. Immunol Lett. 2010 Jun 15;131(1):24-32. Epub 2010 Apr 2. PMID: 20363256

4. Stahn C, Schellmann S, Jakstadt M, Burmester G.R., Buttgereit F. Transfection with exon specific GCR-siRNA alters gene and protein expression of the cytosolic glucocorticoid receptor in HeLa cells. Ann Rheum Dis 2009;68(Suppl3):175

5. Gaber T., Erekul K.B., Fangradt M., Tykwinska K., Hahne M., Maschmeyer P., Wagegg M., Schellmann S., Stahn C., Jakstadt M., Kolar P., Dziurla R., Burmester G.R., Buttgereit F. CD4 T cells under pathophysiological hypoxia: Dexamethasone impairs hypoxia inducible factor (HIF)-1 alpha via suppression of macrophage migration inhibitory factor (MIF). Ann Rheum Dis 2009;68(Suppl3):370

6. Stahn C, Buttgereit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. Nat Clin Pract Rheumatol. 2008 Oct;4(10):525-33. Epub 2008 Sep 2. Review. PMID: 18762788

7. Löwenberg M, Stahn C, Hommes DW, Buttgereit F. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. Steroids. 2008 Oct;73(9-10):1025-9. Epub 2007 Dec 14. Review. PMID: 18221974

8. Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. Mol Cell Endocrinol. 2007 Sep 15;275(1-2):71-8. Epub 2007 Jun 2. Review. PMID: 17630118

Vorträge

1. Stahn C. Analyse der Herkunft und Funktion membranständiger Glucocorticoidrezeptoren; Klinisches Seminar der Rheumatologie; 10.12.2007, Berlin
2. Stahn C. Transfection with exon specific GCR-siRNA alters gene and protein expression of the cytosolic glucocorticoid receptor in HeLa cells. 3 x 3 Abstract Präsentation; 37. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), 24.09.2009, Köln
3. Stahn C. Analysis of origin and function of membrane-bound glucocorticoid receptors; DRFZ Lab Seminar Series: 30.03.2010; Berlin

Posterpräsentationen

(nur Erstautorenschaften)

1. Stahn C., Schellmann S. , Jakstadt M., Burmester G.-R., Buttgereit F. RNA-Interference alter gene and protein expression of the cytosolic glucocorticoid receptor in HEK 293T cells; EULAR (the European league against rheumatism) Annual European Congress of Rheumatology 2009, Kopenhagen

2. Stahn C., Schellmann S. , Jakstadt M. Gaber T., Hahne M., Fangradt M., Kolar P., Wagegg M., Maschmeyer P. Burmester G.-R., Buttgereit F. Transfection with exon specific GCR-siRNA alters gene and protein expression of the cytosolic glucocorticoid receptor in HEK293T cells; 37. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh); 2009, Köln

3. Strehl C., Schellmann S. , Jakstadt M., Burmester G.-R., Buttgereit F. Origin and functional activity of membrane-bound glucocorticoid receptors; EULAR (the European league against rheumatism) Annual European Congress of Rheumatology 2011, London

4. Strehl C., Gaber T., Jakstadt M., Hahne M., Hoff P. Burmester G.-R., Buttgereit F. Origin and functional activity of membrane bound glucocorticoid receptors; 39. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh); 2011, München

Anhang

10. Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle X.1: vorkommende Abkürzungen

Abkürzung	Beschreibung
A	Adenin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Aktivierungsfunktion
AP-1	activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATF2	activating transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicichoninic acid
BreA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CF	cytoplasmatische Fraktion
CO	Kohlenmonoxid
CO_2	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CRH	corticotrophin releasing hormon
CXCL	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand
CXCR	Chemokin (C-X-C Motiv) Rezeptor
Cy5	Cyanin 5
DBD	DNA-Bindungsdomäne
Dex	Dexamethason
Dex-BSA	Dexamethason-BSA
Dig	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
(m)ER	(membranständiger) Östrogenrezeptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescent activated cell sorter
FKS	fetales Kälberserumalbumin
FPS	Fluoropalmitinsäure
FSH	follikelstimulierendes Hormon
G	Guanin
GC	Glucocorticoid
(m/c)GCR	(membranständiger/cytosolischer) Glucocorticoidrezeptor
GFP	green fluorescent protein
GRE	glucocorticoid response element
HEK	human embryonic kidney
HMA	Hydroxymyristinsäure
11-β-HSD	11-β-Hydroxysteroid Dehydrogenase
Hsp	Hitzeschockprotein
IFNγ	Interferon γ

Abkürzung	Beschreibung
IκB	Inhibitor of NKκ B
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRF3	interferon regulatory factor 3
-K	Negativkontrolle
+K	Positivkontrolle
LH	luteinisierendes Hormon
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetic activated cell sorter
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
Max	MYC associated factor X
2-ME	β-Mercaptoethanol
MF	Membranfraktion
Mon	Monensin
MEF2	myosite enhancing factor
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
MT2A	Mettallothionein 2A
NFκB	nuclear factor kappa B
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PJ	Propidiumjodid
PK	Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
pLL	pLentiLox
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
(m)PR	(membranständiger) Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinyldifluorid
RA	rheumatoide Arthrits
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferrenz
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEGRA	selective glucocorticoid receptor agonist
sh	small hairpin
si	small interfering
Stat1	signal transducer and activator of transcription 1
T	Thymin
TCR	T Zell Rezeptor
TEMED	Tetra-methyl-ethylenediamine
TF	Transkriptionsfaktor
TM	Tunikamycin
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Ü	Überstand

Tabelle X.2: vorkommende Einheiten/SI-Einheiten

Abkürzung	Beschreibung
°C	Grad Celcius
d	Tag
g	Gramm
***g**	fache Erdbeschleunigung
h	Stunde

Abkürzung	Beschreibung
l	Liter
µl	Mikroliter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mol	mol
µM	Mikromolar
nM	Nanomolar
s	Sekunde
rpm	Umdrehung pro Minute

10.2 Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abbildung I.1: Wirkung von Hormonen.....23
Abbildung I.2: Darstellung der Steroidhormon-Biosynthese.....26
Abbildung I.3: Nebenwirkungen der Glucocorticoide.....31
Abbildung I.4: Bildung unterschiedlicher Glucocorticoidrezeptorvarianten.....33
Abbildung I.5: Die Domänenstruktur des Glucocorticoidrezeptors.....34
Abbildung I.6: Genomische Wirkmechanismen von Glucocorticoiden.....35
Abbildung I.7: Nicht-genomische Wirkmechanismen von Glucocorticoiden.....36
Abbildung I.8: Nachweis von membranständigen Glucocorticoidrezeptoren mittels hochsensitiver Immunfluoreszenz Färbung.....38
Abbildung I.9: Nachweis des mGCR auf humanen Monozyten.....39
Abbildung I.10: Nicht-genomische GC vermittelte Immunosuppression in T-Zellen.....40
Abbildung I.11: Bindung des humanen Progesteronrezeptors als Dimer an die DNA...42

Material und Methoden

Abbildung II.1: Magnetisch aktivierte Zellsortierung.....65
Abbildung II.2: Repräsentative Darstellung einer Bioanalyzer Analyse einer Probe Total RNA.....70
Abbildung II.3: Amplifikationskurve einer Real-Time-PCR.....73
Abbildung II.4: Ableitung der Schmelzkurve einer Real-Time-PCR.....74
Abbildung II.5: Ermittlung der Dexa-BSA Nettoeffekte.....76
Abbildung II.6: Protein-gehaltsbestimmung mittels BCA Verfahren.....77
Abbildung II.7: Prinzip ELISA.....78
Abbildung II.8: Aufbau einer Blotting-Apparatur im Tank-Blot-System.....79
Abbildung II.9: Schema einer Immunpräzipitation.....81
Abbildung II.10: Prinzip Phosphoprotein Bio®-Plex.....83

Ergebnisse

Abbildung III.1: Auswahl der geeigneten Zelllinie mittels hochsensitiver Immunfluoreszenzfärbung des mGCR.....90
Abbildung III.2: Effekte verschiedener Einflüsse auf die mGCR Expression in humanen HEK 293T Zellen.....91
Abbildung III.3: Effekte einiger Inhibitoren auf die mGCR Expression in humanen HEK 293T Zellen.....92
Abbildung. III.4: Zuordnung der entworfenen siRNAs zu den Exons des humanen GCR Gens.....94

Abbildung III.5: Effekte des siRNA vermittelten GCR Knockdowns auf RNA Ebene.....94
Abbildung III.6: Beispiel für die Effekte des siRNA vermittelten GCR Knockdowns auf Proteinebene.....95
Abbildung III.7: Effekte des siRNA vermittelten GCR Knockdowns auf die cGCR Proteinmenge.....95
Abbildung III.8: Beispiel für Effekte des siRNA vermittelten GCR Knockdowns auf mGCR Proteinebene.....97
Abbildung III.9: Einfluss des siRNA vermittelten GCR Knockdowns auf die mGCR Expression.....97
Abbildung III.10: Nachweis positiver pLL3.7 GCR sh3 Klone mittels Kolonie-PCR.....100
Abbildung III.11: Ergebnis einer Sequenzierung des pLL 3.7 GCR sh3 Plasmids.....100
Abbildung III.12: Anreicherung positiv transduzierter HEK 293T Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung.....101
Abbildung III.13: Effekte des shRNA vermittelten GCR Knockdowns auf RNA Ebene....102
Abbildung III.14: Nachweis der Funktionalität des stabilen GCR-Knockdowns mittels Reportergenassay.....103
Abbildung III.15: Effekte des shRNA vermittelten GCR Knockdowns auf cGCR Proteinebene 104
Abbildung III.16: Gatingstrategie zur Auswertung mGCR positiver Zellen.....105
Abbildung III.17: Effekte des shRNA vermittelten GCR Knockdowns auf mGCR Ebene.....106
Abbildung III.18: Kontrolle der Funktionalität des stabilen GCR Mehrfach-Knockdowns.....107
Abbildung III.19: Effekte des shRNA vermittelten Mehrfach-Knockdowns auf mGCR Ebene.....108
Abbildung III.20: Beispiel für eine Western Blot Analyse einer GCR-IP nach Standardprotokoll.....110
Abbildung III.21: Western Blot Analyse einer GCR-IP zur Optimierung der Effizienz der Präzipitation.....111
Abbildung III.22: Western Blot Analyse einer GCR-IP mit humanen CD14+ Monozyten.....111
Abbildung III.23: Western Blot Analyse einer mGCR-IP mit humanen CD14+ Monozyten.....113
Abbildung III.24: Anreicherung membranständiger Proteine mittels Mem-PER® Kit.....114
Abbildung III.25: Anreicherung membranständiger Proteine mittels Mem-PER® Kit mit anschließender GCR-IP.....114
Abbildung III.26: Luciferase-Reportergenassay zur Kontrolle der Reinheit des Dex-BSA.....117
Abbildung III.27: Luciferase-Reportergenassay zur Kontrolle des Einflusses des Aufbewahrungsortes des Dex-BSA.....118
Abbildung III.28: Aufnahme der drei PepChip™-Kinase-Arrays.....120

Abbildung III.29: Überblick über die durch Dex-BSA mittels Kinasen-(de)phosphorylierung beeinflussten biologische Prozesse.....121
Abbildung III.30: Etablierung eines Phosphoprotein Bio-Plex® mittels Stimulation von T-Zellen.....123
Abbildung III.31: Nachweis der mittels PepChip™ identifizierten verstärkten Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase mittels Phosphoprotein Bio-Plex® und Western Blot Analyse..... 124
Abbildung III.32: Analyse der aus stimulierten Monozyten gewonnenen Zellkulturüberstände mittels TNFα ELISA.....125
Abbildung III.33: Anzahl der durch Dex, BSA oder Dex-BSA regulierten Gene.....126
Abbildung III.34: Vergleich der für die Genexpression mittels Microarray ermittelten Daten mit Daten einer semiquantitativen RT-PCR.....127
Abbildung III.35: Zuordnung der Gene aus der vergleichenden Genexpressionsanalyse zu biologischen Prozessen.....128

Diskussion

Abbildung. IV.1: Allgemeiner Überblick über Entstehung und funktionelle Aktivität des mGCR auf.....147

10.3 Tabellenverzeichnis

Einleitung

Tabelle I.1: Klassen der Steroidhormone.....26
Tabelle I.2: Antientzündliche und immunsuppressive Effekte von Glucocorticoiden auf die unterschiedlichen Zelltypen.....29

Material & Methoden

Tabelle II.1: Zelllinien.....53
Tabelle II.2: Bakterienstämme.....53
Tabelle II.3: Zellkulturmedien und Supplementierungen.....54
Tabelle II.4: Bakterienmedien und Zusätze.....54
Tabelle II.5: Antikörper, Antikörperkonjugate und Beads.....54
Tabelle II.6: Plasmide und Vektoren.....55
Tabelle II.7: siRNA Sequenzen.....55
Tabelle II.8: shRNA Sequenzen der Vektoren.....56
Tabelle II.9: PCR-Primer von TIB-Molbiol.....56
Tabelle II.10: Chemikalienliste.....57
Tabelle II.11: Antibiotika.....58
Tabelle II.12: Molekulargewichtstandards.....59
Tabelle II.13: Restriktionsenzyme und Puffer.....59
Tabelle II.14: Lösungen und Puffer.....59
Tabelle II.15: Kits.....60
Tabelle II.16: Geräte.....60
Tabelle II.17: sonstige Materialien.....61
Tabelle II.18: Software.....62
Tabelle II.19: PCR Ansatz für die Kolonie-PCR.....71
Tabelle II.20: PCR Programm für die Kolonie-PCR.....72
Tabelle II.21: PCR Ansatz für die Sequenzierungs-PCR.....72
Tabelle II.22: PCR Programm für die Sequenzierungs-PCR.....72
Tabelle II.23: Zusammensetzung der Gele nach Sambrock.....79

Ergebnisse

Tabelle III.1: Übersicht aller siRNA vermittelten Effekte.....98
Tabelle III.2: Entworfene shRNAs aus siRNA Sequenzen.....99
Tabelle III.3: Anreicherung der eGFP positiven HEK 293T Zellen.....101
Tabelle III.4: Übersicht aller shRNA vermittelten Effekte.....109
Tabelle III.5: Übersicht aller durch Dex-BSA Stimulation verstärkt oder vermindert phosphorylierten Kinase-Substrate.....122

Anhang

Tabelle X.1: vorkommende Abkürzungen.....179
Tabelle X.2: vorkommende Einheiten/SI-Einheiten.....180
Tabelle X.3: Differentielle Genexpression mGCR exprimierender humaner Monozyten. Durch Dex-BSA verstärkt exprimierte Gene.....187
Tabelle X.4: Differentielle Genexpression mGCR exprimierender humaner Monozyten. Durch Dex-BSA vermindert exprimierte Gene.....190

10.4 Ergänzende Daten

Tabelle X.3: Differentielle Genexpression mGCR exprimierender humaner Monozyten. Durch Dex-BSA verstärkt exprimierte Gene.

Gensymbol	Genbeschreibung	Accession-Nummer
DYRK3	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	NM_001004023
AA425812	Homo sapiens cDNA clone IMAGE: similar to contains Alu repetitive element;, mRNA sequence	AA425812
KIAA1641	KIAA1641	NM_020970
AAK1	Homo sapiens AP2 associated kinase 1 (AAK1), mRNA [NM_014911]	NM_014911
TMEM109	Homo sapiens transmembrane protein 109 (TMEM109), mRNA [NM_024092]	NM_024092
UPK2	uroplakin 2 (UPK2)mRNA., development; integral to plasma membrane	NM_006760
S100A14	S100 calcium binding protein A14	NM_020672
SIRPG	Homo sapiens signal-regulatory protein gamma (SIRPG), transcript variant 1, mRNA [NM_018556]	NM_018556
DUOX2	Dual oxidase 2	NM_014080
MANEAL	Homo sapiens mannosidase, endo-alpha-like (MANEAL), transcript variant 2, mRNA [NM_152496]	NM_152496
DKFZP564O0823	Homo sapiens DKFZP564O0823 protein (DKFZP564O0823), mRNA [NM_015393]	NM_015393
GIPR	Homo sapiens gastric inhibitory polypeptide receptor (GIPR), mRNA [NM_000164]	NM_000164
DCBLD1	Homo sapiens discoidin, CUB and LCCL domain containing 1 (DCBLD1), mRNA [NM_173674]	NM_173674
SMARCA4	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	NM_003072
DIAPH1	Diaphanous homolog 1 (Drosophila)	NM_005219
AI911989	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2337732 3', mRNA sequence [AI911989]	AI911989
AK130705	Homo sapiens cDNA FLJ27195 fis, clone SYN02786. [AK130705]	AK130705
SON	Homo sapiens SON DNA binding protein (SON), transcript variant b, mRNA [NM_032195]	NM_032195
ZNFX1	Homo sapiens zinc finger, NFX1-type containing 1 (ZNFX1), mRNA [NM_021035]	NM_021035
AL137342	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761G1111 (from clone DKFZp761G1111). [AL137342]	AL137342
GPR68	G protein-coupled receptor 68	NM_003485
CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1 (CCR1)mRNA	NM_001295
AF085902	Homo sapiens full length insert cDNA clone YQ50C11. [AF085902]	AF085902
TMEM86A	Homo sapiens transmembrane protein 86A (TMEM86A), mRNA [NM_153347]	NM_153347
AK092698	Homo sapiens cDNA FLJ35379 fis, clone SKMUS2006481. [AK092698]	AK092698
ENC1	Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	NM_003633
MGC16385	Homo sapiens hypothetical protein MGC16385 (MGC16385), mRNA [NM_145039]	NM_145039
YPEL2	Homo sapiens yippee-like 2 (Drosophila) (YPEL2), mRNA [NM_001005404]	NM_001005404
PRSS23	Protease, serine, 23	NM_007173
CAMTA1	Homo sapiens calmodulin binding transcription activator 1 (CAMTA1), mRNA [NM_015215]	NM_015215
BG571083	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4713911 5', mRNA sequence [BG571083]	BG571083
COTL1	Human autonomously replicating sequence (ARS) mRNA. [L08436]	L08436

Gensymbol	Genbeschreibung	Accession-Nummer
AK021798	Homo sapiens cDNA FLJ11736 fis, clone HEMBA1005468. [AK021798]	AK021798
MGC4677	hypothetical protein MGC4677	BC010491
BC017893	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4248887, partial cds. [BC017893]	BC017893
BCHE	Butyrylcholinesterase	NM_000055
PRKAG1	Protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit	NM_212461
PP1345	hypothetical protein PP1345	AF217973
L17326	Human pre-T/NK cell associated protein (1F6) mRNA, 3' end. [L17326]	L17326
PSCD2L	Homo sapiens pp9943 mRNA, complete cds. [AF318380]	AF318380
AU121805	AU121805 MAMMA1 Homo sapiens cDNA clone MAMMA1001009 5', mRNA sequence [AU121805]	AU121805
AK027319	Homo sapiens cDNA FLJ14413 fis, clone HEMBA1004670. [AK027319]	AK027319
AK125099	Homo sapiens cDNA moderately similar to Homo sapiens general transcription factor II, i (GTF2I). [AK125099]	AK125099
CR627362	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686H21113 (from clone DKFZp686H21113). [CR627362]	CR627362
ENST00000328398	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:40022889. [BC104744]	BC104744
WNT4	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 4 (WNT4), mRNA [NM_030761]	NM_030761
AK024824	Homo sapiens cDNA: FLJ21171 fis, clone CAS10962. [AK024824]	AK024824
CYP2C9	cytochrome P450family 2subfamily Cpolypeptide 9 (CYP2C9)mRNA.	NM_000771
LRRC4	Leucine rich repeat containing 4	NM_022143
THC2294276	ALU2_HUMAN (P39189) Alu subfamily SB sequence contamination warning entry, partial (17%) [THC2294276]	
AK026485	Homo sapiens cDNA: FLJ22832 fis, clone KAIA4195. [AK026485]	AK026485
LOC646326	Homo sapiens, clone IMAGE:4590099, mRNA. [BC048193]	BC048193
TCF7L2	Homo sapiens transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box) (TCF7L2), mRNA [NM_030756]	NM_030756
BC030992	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4273559, partial cds. [BC030992]	BC030992
NUAK1	Homo sapiens NUAK family, SNF1-like kinase, 1 (NUAK1), mRNA [NM_014840]	NM_014840
AK124941	Homo sapiens cDNA FLJ42951 fis, clone BRSTN2007765. [AK124941]	AK124941
ENST00000302932	Human tissue plasminogen activator mRNA, partial cds. [U63828]	U63828
S79672	Homo sapiens EWS/WT1 fusion protein (EWS1/WT1) mRNA, partial cds. [S79672]	S79672
ZNF702	Homo sapiens zinc finger protein 702 (ZNF702), mRNA [NM_024924]	NM_024924
HDGFL1	Homo sapiens hepatoma derived growth factor-like 1 (HDGFL1), mRNA [NM_138574]	NM_138574
AL833303	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp451M139 (from clone DKFZp451M139). [AL833303]	AL833303
EGR4	Homo sapiens early growth response 4 (EGR4), mRNA [NM_001965]	NM_001965
C10orf38	Chromosome 10 open reading frame 38	NM_001010924
BMP4	Homo sapiens bone morphogenetic protein 4 (BMP4), transcript variant 1, mRNA [NM_001202]	NM_001202
MYO1G	Homo sapiens mRNA for FLJ00121 protein. [AK074050]	AK074050
SPFH1	Homo sapiens SPFH domain family, member 1 (SPFH1), mRNA [NM_006459]	NM_006459
CYP7A1	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	NM_000780
AK124396	Homo sapiens cDNA FLJ42405 fis, clone ASTRO3000474. [AK124396]	AK124396
MGC16121	hypothetical protein MGC16121	BC007360

Gensymbol	Genbeschreibung	Accession-Nummer
MYH11	Homo sapiens myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle (MYH11), transcript variant SM2A,	NM_022844
AK130118	Homo sapiens cDNA FLJ26608 fis, clone LVR00914. [AK130118]	AK130118
DOCK4	Homo sapiens cDNA FLJ30935 fis, clone FEBRA2007176. [AK055497]	AK055497
AK057167	Homo sapiens cDNA FLJ32605 fis, clone STOMA1000175. [AK057167]	AK057167
FUT7	fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase) Golgi apparatus; transferring glycosyl groups	NM_004479
AL831999	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp451K063 (from clone DKFZp451K063). [AL831999]	AL831999
LOC142937	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3454038. [BC008131]	BC008131
AK022443	Homo sapiens cDNA FLJ12381 fis, clone MAMMA1002566. [AK022443]	AK022443
SCG3	Secretogranin III	NM_013243
BI497361	df135e07.y1 Morton Fetal Cochlea Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2537964 5', mRNA sequence [BI497361]	BI497361
FLJ13137	hypothetical gene supported by AK125122	AK125122
ENST00000221462	Homo sapiens hypothetical protein LOC284352, , with apparent retained intron. [BC039061]	BC039061
LOC644319	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC644319 (LOC644319), mRNA [XM_927487]	XM_927487
C18orf1	Chromosome 18 open reading frame 1	NM_181482
PTPN23	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23 (PTPN23), mRNA [NM_015466]	NM_015466
MARVELD1	MARVEL domain containing 1	NM_031484
PRKAR2B	protein kinasecAMP-dependentregulatorytype IIbeta , 3',5'-cAMP binding activity;	NM_002736
AK123446	Homo sapiens cDNA FLJ41452 fis, clone BRSTN2010363. [AK123446]	AK123446
SLC25A37	Homo sapiens cDNA FLJ36612 fis1, highly similar to Homo sapiens mitochondrial solute carrier mRNA	AK093931
SMG1	Homo sapiens PI-3-kinase-related kinase SMG-1 (SMG1), mRNA [NM_015092]	NM_015092
ZNF414	Homo sapiens zinc finger protein 414 (ZNF414), mRNA [NM_032370]	NM_032370
THC2302865	FABE_HUMAN (Q01469) Fatty acid-binding protein, epidermal (E-FABP)	BM921634
RP11-561O23.4	Homo sapiens cDNA FLJ40320 fis, clone TESTI2030770. [AK097639]	AK097639
GNPTAB	Homo sapiens N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits (GNPTAB),	NM_024312
LOC391403	Homo sapiens cDNA FLJ31276 fis, clone KIDNE2006376,	AK055838
ENST00000366699	Homo sapiens cDNA FLJ90385 fis, clone NT2RP2005247	AK074866
MGC2865	hypothetical protein MGC2865 (MGC2865)mRNA.	NM_032375
TFAP2E	Homo sapiens transcription factor AP-2 epsilon (activating enhancer binding protein 2 epsilon) (TFAP2E)	NM_178548
MGC24039	Homo sapiens hypothetical protein MGC24039, mRNA (cDNA clone IMAGE:4286826), complete cds. [BC020855]	BC020855
KIAA0484	Homo sapiens mRNA, chromosome 1 specific transcript KIAA0484. [AB007953]	AB007953
AK023737	Homo sapiens cDNA FLJ13675 fis, clone PLACE1011875, highly similar to Homo sapiens mRNA for KIAA0580	AK023737
THC2381319	BC022074 C6orf102 protein (Homo sapiens) , partial (6%) [THC2381319]	
CCDC86	Homo sapiens coiled-coil domain containing 86 (CCDC86), mRNA [NM_024098]	NM_024098
RALGDS	Homo sapiens ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RALGDS),	NM_006266

Gensymbol	Genbeschreibung	Accession-Nummer
	transcript variant 1, mRNA [NM_006266]	
IGF2R	Homo sapiens insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R), mRNA [NM_000876]	NM_000876
AK002210	Homo sapiens cDNA FLJ11348 fis, clone PLACE4000638. [AK002210]	AK002210
TSC22D3	TSC22 domain family, member 3	NM_004089
T47335	T47335 yb10e12.s1 Stratagene placenta (#937225) Homo sapiens cDNA clone IMAGE:70798 3'	T47335
LAMC2	Homo sapiens laminin, gamma 2 (LAMC2), transcript variant 2, mRNA [NM_018891]	NM_018891
DZIP3	Homo sapiens mRNA for KIAA0675 protein, partial cds. [AB014575]	AB014575
ENST00000369158	Homo sapiens histone 2, H3c, mRNA (cDNA clone IMAGE:3913365). [BC015544]	BC015544
AF119852	Homo sapiens PRO1728 mRNA, complete cds. [AF119852]	AF119852
DDIT4L	Homo sapiens DNA-damage-inducible transcript 4-like (DDIT4L), mRNA [NM_145244]	NM_145244
LOC440295	Homo sapiens hypothetical protein LOC440295 (LOC440295), mRNA [NM_198181]	NM_198181
BX344068	Homo sapiens PLACENTA COT 25-NORMALIZED Homo sapiens cDNA clone CS0DI052YA09 3-PRIME,	BX344068
TSPYL3	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686H14196 (from clone DKFZp686H14196). [BX647159]	BX647159
FLJ21839	Homo sapiens hypothetical protein FLJ21839 (FLJ21839), transcript variant 2, mRNA [NM_021831]	NM_021831
PRG2	Homo sapiens proteoglycan 2, bone marrow (natural killer cell activator, eosinophil granule major basic protein)	NM_002728
LTBP4	Homo sapiens latent transforming growth factor beta binding protein 4 (LTBP4), transcript variant 2,	NM_003573
ENST00000343732	Homo sapiens cDNA FLJ46757 fis, clone TRACH3023752. [AK128598]	AK128598
ZNF12	Homo sapiens zinc finger protein 12 (ZNF12), transcript variant 1, mRNA [NM_016265]	NM_016265
AK023376	Homo sapiens cDNA FLJ13314 fis, clone OVARC1001506, highly similar to POLYCYSTIN PRECURSOR.	AK023376

Tabelle X.4: Differentielle Genexpression mGCR exprimierender humaner Monozyten. Durch Dex-BSA vermindert exprimierte Gene.

Gensymbol	Genbeschreibung	Accession-Nummer
F3	coagulation factor III (thromboplastintissue factor) (F3)mRNA. , blood coagulation; blood coagulation factor activity;	NM_001993
THC2280837	HESX_HUMAN (Q9UBX0) Homeobox expressed in ES cells 1 (Homeobox protein ANF) (hAnf), partial (72%) [	
SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)	NM_005985
TIMP3	TIMP metallopeptidase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	AA837799
MMP10	Homo sapiens matrix metallopeptidase 10 (stromelysin 2) (MMP10), mRNA [NM_002425]	NM_002425
LILRB5	Homo sapiens leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 5	NM_006840
TBC1D8	Homo sapiens cDNA FLJ40805 fis, clone TRACH2009060. [AK098124]	AK098124
ALS2CR13	Homo sapiens amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region,	NM_173511

Gensymbol	Genbeschreibung	Accession-Nummer
	candidate 13 (ALS2CR13), mRNA	
RASD1	RAS, dexamethasone-induced 1	NM_016084
PLCB1	Homo sapiens phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific) (PLCB1), transcript variant 2, mRNA	NM_182734
CCNE2	cyclin E2 (CCNE2)transcript variant 1mRNA.	NM_057749
HLA-DQA1	Human (clones 5, 9) MHC class II HLA-DQA1*03011 mRNA, partial cds. [L34088]	L34088
DNAJC4	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4, mRNA	BC010145
TNS1	Homo sapiens tensin 1 (TNS1), mRNA [NM_022648]	NM_022648
SGOL2	Homo sapiens shugoshin-like 2 (S. pombe) (SGOL2), mRNA [NM_152524]	NM_152524
MORC4	MORC family CW-type zinc finger 4	NM_024657
LCN2	lipocalin 2 (oncogene 24p3) (LCN2)mRNA., binding activity; cytoplasm; soluble fraction; transport;	NM_005564
SMEK2	Homo sapiens KIAA1387 protein (SMEK2), mRNA [NM_020463]	NM_020463
MLLT10	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10	NM_004641
MUC5AC	Homo sapiens mucin (MUC 5AC) mRNA, partial cds. [AF015521]	AF015521
BG989839	BG989839 PM0-HT0913-200101-004-f03 HT0913 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence [BG989839]	BG989839
MGC45491	Homo sapiens hypothetical protein MGC45491 (MGC45491), mRNA [NM_153246]	NM_153246
LIG4	Homo sapiens ligase IV, DNA, ATP-dependent (LIG4), transcript variant 1, mRNA [NM_002312]	NM_002312
EIF2C1	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2C, 1 (EIF2C1), mRNA [NM_012199]	NM_012199
FLJ22028	Homo sapiens hypothetical protein FLJ22028 (FLJ22028), mRNA [NM_024854]	NM_024854
ADHFE1	Alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	NM_144650
CR626252	full-length cDNA clone CS0DD001YO10 of Neuroblastoma Cot 50-normalized of Homo sapiens (human).	CR626252
MXD1	Homo sapiens MAX dimerization protein 1 (MXD1), mRNA [NM_002357]	NM_002357
AI925475	wo30h04.x1 NCI_CGAP_Gas4 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2456887 3'	AI925475
FBXO36	Homo sapiens F-box protein 36, mRNA (cDNA clone MGC:26691 IMAGE:4817261), complete cds. [BC022538]	BC022538
RABL2A	Homo sapiens RAB, member of RAS oncogene family-like 2A, mRNA	BC111008
THC2343919	M44D_MOUSE (Q99N05) Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 4D, partial (5%) [THC2343919]	
BM667833	BM667833 UI-E-DW0-agj-g-19-0-UI.s1 UI-E-DW0 Homo sapiens cDNA clone UI-E-DW0-agj-g-19-0-UI 3'	BM667833
AK026368	Homo sapiens cDNA: FLJ22715 fis, clone HSI13726. [AK026368]	AK026368
LOC344967	Homo sapiens cDNA FLJ43309 fishighly similar to Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	AK125299
USP3	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 3 (USP3), mRNA [NM_006537]	NM_006537
STAC	Homo sapiens SH3 and cysteine rich domain (STAC), mRNA [NM_003149]	NM_003149
RDH10	Homo sapiens retinol dehydrogenase 10 (all-trans) (RDH10), mRNA [NM_172037]	NM_172037
LOC441220	Homo sapiens cDNA FLJ31470 fis, clone NT2NE2001432. [AK056032]	AK056032
PNPLA1	Homo sapiens patatin-like phospholipase domain containing 1 (PNPLA1), transcript variant 1, mRNA [NM_173676]	NM_173676
C1orf115	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 115 (C1orf115), mRNA	NM_024709

Gensymbol	Genbeschreibung	Accession-Nummer
	[NM_024709]	
C19orf30	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 30 (C19orf30), mRNA [NM_174947]	NM_174947
AY295762	Homo sapiens SMARCA2 mRNA, partial sequence. [AY295762]	AY295762
BIC	Homo sapiens BIC transcript (BIC) on chromosome 21 [NR_001458]	NR_001458
PRPS2	Homo sapiens phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2 (PRPS2), transcript variant 2, mRNA [NM_002765]	NM_002765
SOCS5	Suppressor of cytokine signaling 5	NM_144949
HEG1	Homo sapiens mRNA for KIAA1237 protein, partial cds. [AB033063]	AB033063
DB328061	DB328061 PLACE5 Homo sapiens cDNA clone PLACE5000090 3', mRNA sequence [DB328061]	DB328061
OIP5	Homo sapiens Opa interacting protein 5 (OIP5), mRNA [NM_007280]	NM_007280
FCRL2	Homo sapiens Fc receptor-like 2 (FCRL2), transcript variant 2, mRNA [NM_030764]	NM_030764
CYP2U1	Cytochrome P450, family 2, subfamily U, polypeptide 1	NM_183075
ITK	Homo sapiens IL2-inducible T-cell kinase (ITK), mRNA [NM_005546]	NM_005546
LCORL	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434K087 (from clone DKFZp434K087). [AL133031]	AL133031
ITLN1	Intelectin 1 (galactofuranose binding)	NM_017625
GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM)mRNA. , GTP binding activity;	NM_005261
C12orf42	Homo sapiens chromosome 12 open reading frame 42 (C12orf42), mRNA [NM_198521]	NM_198521
CR600369	full-length cDNA clone CS0DF025YM09 of Fetal brain of Homo sapiens (human). [CR600369]	CR600369
BI523298	BI523298 603175578T1 NIH_MGC_121 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5239842 3', mRNA sequence	BI523298
CREB1	alpha beta CREB-1=cyclic AMP response element-binding protein-1 alpha beta isoform	S78695
SPRY3	Homo sapiens sprouty homolog 3 (Drosophila) (SPRY3), mRNA [NM_005840]	NM_005840
THC2268548	VGLN_HUMAN (Q00341) Vigilin (High density lipoprotein-binding protein) (HDL-binding protein), partial (17%)	BF592096
HIST1H2AM	Homo sapiens histone 1, H2am (HIST1H2AM), mRNA [NM_003514]	NM_003514
AW075437	AW075437 xb23c01.x1 NCI_CGAP_Kid13 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2577120 3'	AW075437
HSD17B12	Homo sapiens hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12 (HSD17B12), mRNA [NM_016142]	NM_016142
MGC21830	Homo sapiens hypothetical protein MGC21830 (MGC21830), mRNA [NM_182563]	NM_182563
RSU1	Homo sapiens Ras suppressor protein 1 (RSU1), transcript variant 1, mRNA [NM_012425]	NM_012425
ENST00000308269	PREDICTED: Homo sapiens similar to unactive progesterone receptor, 23 kD (LOC441050), mRNA [XM_496721]	XM_496721
FUBP3	Homo sapiens far upstream element (FUSE) binding protein 3 (FUBP3), mRNA [NM_003934]	NM_003934
NPAS2	Homo sapiens neuronal PAS domain protein 2 (NPAS2), mRNA [NM_002518]	NM_002518
AREG	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) (AREG)mRNA. , cell proliferation; cell-cell signaling;	NM_001657
BQ286694	ik33b06.x1 HR85 islet Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5782618 3', mRNA sequence [BQ286694]	BQ286694
AK125361	Homo sapiens cDNA FLJ43371 fis, clone NTONG2005969. [AK125361]	AK125361

Gensymbol	Genbeschreibung	Accession-Nummer
ENST00000219169	full-length cDNA clone CS0DI061YF17 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human). [CR621534]	CR621534
BX648207	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686E16168 (from clone DKFZp686E16168). [BX648207]	BX648207
TMPO	Homo sapiens thymopoietin (TMPO), transcript variant 1, mRNA [NM_003276]	NM_003276
WWC2	Homo sapiens WW, C2 and coiled-coil domain containing 2 (WWC2), mRNA [NM_024949]	NM_024949
EEF2K	Homo sapiens eukaryotic elongation factor-2 kinase (EEF2K), mRNA [NM_013302]	NM_013302
U78519	Human cAMP-binding guanine nucleotide exchange factor IV (cAMP-GEFIV) mRNA, clone W15, partial sequence.	U78519
AK057720	Homo sapiens cDNA FLJ33158 fis, clone UTERU2000418. [AK057720]	AK057720
METT5D1	Homo sapiens methyltransferase 5 domain containing 1 (METT5D1), mRNA [NM_152636]	NM_152636
NUDT12	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 12	NM_031438
NLN	Homo sapiens neurolysin (metallopeptidase M3 family) (NLN), mRNA [NM_020726]	NM_020726
AA132288	AA132288 zo27h09.r1 Stratagene colon (#937204) Homo sapiens cDNA clone IMAGE:588161 5', mRNA sequence	AA132288
SCD5	Homo sapiens stearoyl-CoA desaturase 5 (SCD5), transcript variant 1, mRNA [NM_001037582]	NM_001037582
AF130099	Homo sapiens clone FLC1464 PRO3102 mRNA, complete cds. [AF130099]	AF130099
AA856716	AA856716 od54a10.s1 NCI_CGAP_GCB1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1371738 3', mRNA sequence	AA856716
PDLIM2	Homo sapiens PDZ and LIM domain 2 (mystique) (PDLIM2), transcript variant 1, mRNA [NM_176871]	NM_176871
AI216457	qh07g09.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1844032 3'	AI216457
H1FOO	Homo sapiens H1 histone family, member O, oocyte-specific (H1FOO), mRNA [NM_153833]	NM_153833
CR1	Homo sapiens complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group) (CR1), transcript variant S, mRNA	NM_000651
CCDC71	Homo sapiens coiled-coil domain containing 71 (CCDC71), mRNA [NM_022903]	NM_022903
ACRC	Acidic repeat containing	NM_052957
HDAC8	Histone deacetylase 8	NM_018486
BC038747	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5268658. [BC038747]	BC038747
PRDX2	Homo sapiens peroxiredoxin 2 (PRDX2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 3, mRNA	NM_181738
CACNG5	Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5	NM_014404
CUZD1	CUB and zona pellucida-like domains 1	NM_022034
AA235034	AA235034 zs36d01.s1 Soares_NhHMPu_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:687265 3', mRNA sequence	AA235034
BU618641	UI-H-FH1-bfk-o-16-0-UI.s1 NCI_CGAP_FH1 Homo sapiens cDNA clone UI-H-FH1-bfk-o-16-0-UI 3',	BU618641
ZNF583	Zinc finger protein 583	NM_152478
DPCR1	Diffuse panbronchiolitis critical region 1	NM_080870
AI818976	wj89h07.x1 NCI_CGAP_Lym12 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2410045 3', mRNA sequence [AI818976]	AI818976
BX332393	BX332393 Homo sapiens NEUROBLASTOMA COT 25-NORMALIZED	BX332393
ANUBL1	AN1, ubiquitin-like, homolog (Xenopus laevis)	NM_174890

Gensymbol	Genbeschreibung	Accession-Nummer
FZD7	frizzled homolog 7 (Drosophila) (FZD7)mRNA., frizzled receptor activity; frizzled receptor signaling pathway;	NM_003507
BC104430	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:40021976. [BC104430]	BC104430
BQ213856	AGENCOURT_7504745 NIH_MGC_92 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6014884 5', mRNA sequence	BQ213856
HIST1H2AA	Homo sapiens histone 1, H2aa (HIST1H2AA), mRNA [NM_170745]	NM_170745
ARRDC3	Homo sapiens arrestin domain containing 3 (ARRDC3), mRNA [NM_020801]	NM_020801
ENST00000377492	Q99KF9 (Q99KF9) Lrpprc protein, partial (39%) [THC2336834]	
ZNF665	Homo sapiens zinc finger protein 665 (ZNF665), mRNA [NM_024733]	NM_024733
CA438802	UI-H-DH0-aus-b-12-0-UI.s1 NCI_CGAP_DH0 Homo sapiens cDNA clone UI-H-DH0-aus-b-12-0-UI 3'	CA438802
SMYD3	Homo sapiens SET and MYND domain containing 3 (SMYD3), mRNA [NM_022743]	NM_022743
GPR92	Homo sapiens G protein-coupled receptor 92 (GPR92), mRNA [NM_020400]	NM_020400
APOA4	Homo sapiens apolipoprotein A-IV (APOA4), mRNA [NM_000482]	NM_000482
AASS	Aminoadipate-semialdehyde synthase	NM_005763
C6orf167	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 167 (C6orf167), mRNA [NM_198468]	NM_198468
AK054562	Homo sapiens mRNA for FLJ00054 protein, partial cds. [AK054562]	AK054562
MGC33367	Homo sapiens hypothetical protein MGC32905 (MGC33367), mRNA [NM_144602]	NM_144602
SMAD6	SMAD, mothers against DPP homolog 6 (Drosophila)	NM_005585
THC2282018	Q9F8M7 (Q9F8M7) DTDP-glucose 4,6-dehydratase (Fragment), partial (11%) [THC2282018]	
ENST00000372602	Homo sapiens hypothetical protein MGC39900, mRNA (cDNA clone IMAGE:3876145),	BC019900
SLC6A13	Homo sapiens solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13, mRNA	BC020867
FOXM1	Forkhead box M1	NM_202002
SYT15	Homo sapiens synaptotagmin XV (SYT15), transcript variant b, mRNA [NM_181519]	NM_181519
L12234	Human aggrecan mRNA, exon 1. [L12234]	L12234
GOLGA8E	Homo sapiens golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8E (GOLGA8E), mRNA [NM_001012423]	NM_001012423
ENST00000333310	Homo sapiens cDNA FLJ12567 fis, clone NT2RM4000855. [AK022629]	AK022629
H16080	ym20e09.r1 Soares infant brain 1NIB Homo sapiens cDNA clone IMAGE:48367 5', mRNA sequence [H16080]	H16080