

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Anatomie II  
Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

**Untersuchungen zum Genexpressionsmechanismus der Glukokortikoid-  
vermittelten Occludin-Induktion an der  
Blut-Hirn-Schranke**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Nina Natascha Harke  
aus  
Würzburg

Würzburg, Dezember 2009

Referent: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

Koreferent: Prof. Dr. med. G. Stoll

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

05. April 2011

Die Promovendin ist Ärztin



<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Funktion und Aufbau der Blut-Hirn-Schranke</b>	<b>1</b>
1.1.1 Endothel und Blut-Hirn-Schranke	1
1.1.2.1 Claudine	3
1.1.2.2 Junction-associated adhesion molecules (JAMs)	4
1.1.2.3 Zonula occludens (ZO)-Proteine	4
<b>1.2 Der Einfluss von Glukokortikoiden auf die Blut-Hirn-Schranke</b>	<b>7</b>
1.2.1 Der Glukokortikoidrezeptor	7
1.2.2 Die Glukokortikoid-Responsivität des Blut-Hirn-Schranken-Endothels	9
<b>2. ZIELSETZUNG</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>12</b>
3.1.1 Enzyme	12
3.1.2 Kits	12
3.1.3 Chemikalien, sonstige Reagenzien	12
3.1.4 Verbrauchsmaterialien	13
3.1.5 Geräte	14
<b>3.2 Methoden</b>	<b>16</b>
3.2.1 Methoden der Zellkultur	16
3.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien	16
3.2.1.1.1 HEK-293-Zellen	16

3.2.1.1.2 COS-7-Zellen	16
3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	16
3.2.1.3 Transiente Transfektion durch Effectene (Qiagen)	17
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	18
3.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	18
3.2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	18
3.2.2.3 DNA-Extraktion	19
3.2.2.3.1 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	19
3.2.2.3.2 DNA-Extraktion durch Rotiphenol-Fällung	19
3.2.2.3.3 Mini-Präparation von Plasmiden	20
3.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
3.2.2.5 PCR-vermittelte in-vitro Mutagenese	22
3.2.2.6 Klonierung von DNA	24
3.2.2.6.1 Schneiden der DNA durch Restriktionsenzyme	24
3.2.2.6.2 Ligierung	24
3.2.2.6.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	25
3.2.2.6.4 Einfrieren von E.coli-Stämmen	25
3.2.2.7 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)	26
3.2.2.8 Transaktivierungsversuche mit dem Dual-Luciferase Assay Kit (Promega)	28
3.2.2.9 Bradford-Assay	30

<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Die Abhängigkeit der Occludin-Expression von dem Glukokortikoidrezeptor</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Glukokortikoid-responsive Elemente des Occludin-Promoters</b>	<b>33</b>
4.2.1 Putative Glukokortikoid-responsive Elemente im Occludin-Promoter	33
4.2.2 Lokalisation des Glukokortikoid-responsiven Elements	36
4.2.2.1 Promoter-Reporter-Gen-Assay	36
4.2.2.2 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	38
4.2.2.3 PCR-vermittelte in-vitro Mutagenese	39
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>43</b>
<b>5.1 Der Einsatz von Glukokortikoiden im klinischen Alltag</b>	<b>43</b>
<b>5.2 Die Gentransaktivierung durch direkte Rezeptor-DNA-Bindung</b>	<b>43</b>
<b>5.3 Das degenerierte Glukokortikoid-responsive Element im Occludin-Promoter</b>	<b>45</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>48</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>50</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Funktion und Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

#### 1.1.1 Endothel und Blut-Hirn-Schranke

Das menschliche Gehirn ist ein höchst spezialisiertes Organ. Um die Funktionen des Gehirns einwandfrei zu gewährleisten, ist die Erhaltung der Homöostase im Hirngewebe von zentraler Bedeutung. Einerseits muss das Gehirn mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden, andererseits muss ein Schutz vor möglichen toxischen Stoffen gesichert sein. Diese Aufgaben werden durch das Blut-Kapillar-System des Gehirns erfüllt. Um Systeme in verschiedene Kompartimente, zum Beispiel Intra- und Extravasalraum, zu unterteilen, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen muss der transzelluläre Weg über verschiedene Transporter und Kanäle auf der apikalen und basalen Zellmembran reguliert werden. Zum anderen muss der parazelluläre Fluss durch passive Diffusion über die Occludenskontakte (Tight Junctions), die den apikalen Interzellularraum nahezu verschließen, eingeschränkt werden.

Die Existenz einer Blut-Hirn-Schranke wurde erstmals 1885 von Ehrlich beschrieben (Ehrlich, 1885), nachdem er nach peripherer Injektion des Farbstoffs „Evans Blau“ feststellte, dass das Gehirnparenchym von der Färbung ausgenommen war, sich bei Applikation in den Liquorraum jedoch anfärben ließ.

Die Kapillarendothelien des Gehirns bilden beim Mensch mit etwa 20 m<sup>2</sup> Oberfläche eines der größten Schrankengewebe (Petty et al. 2002). Dabei unterscheiden sich die Eigenschaften und die Morphologie der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke stark von denen übriger Endothelien.

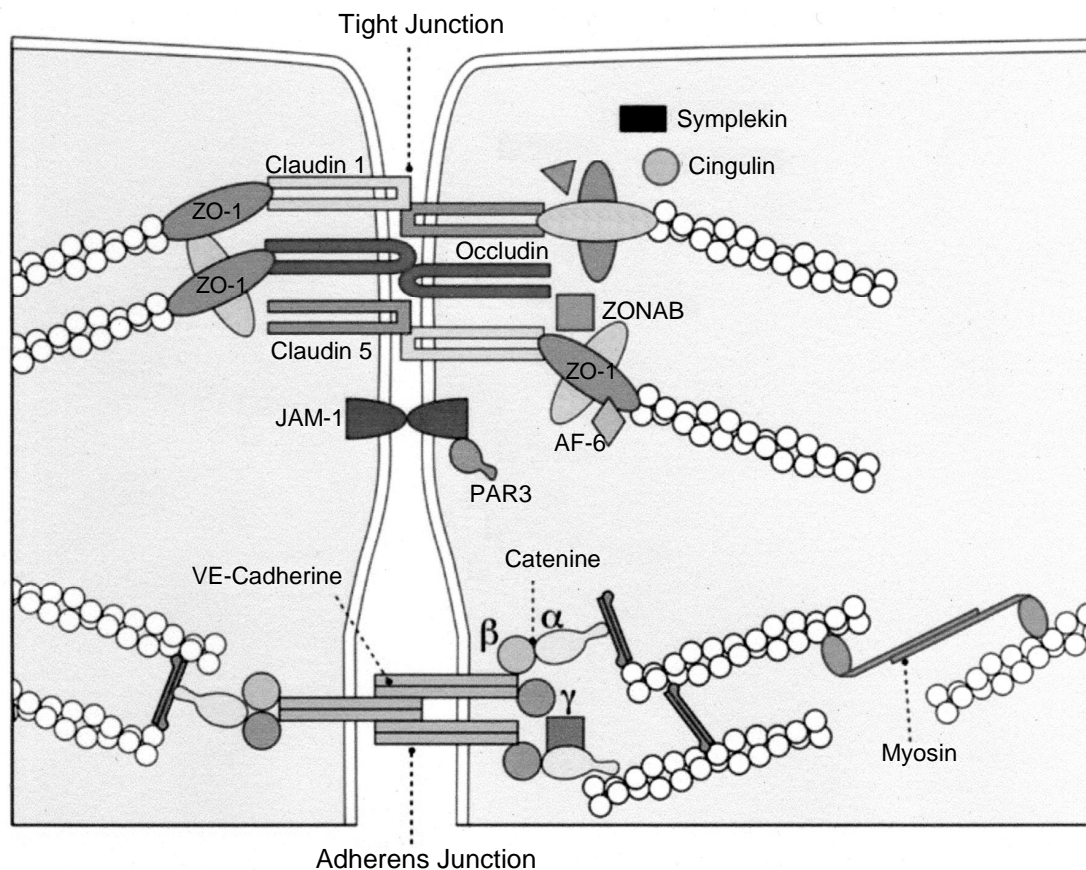
### 1.1.2 Die Tight Junctions

Die Hauptkomponenten, die für die Barrierefunktion verantwortlich sind, sind die Verschlusskontakte, Tight Junctions (Kniesel et al. 2000). Ihre Struktur wurde bereits vor 40 Jahren intensiv durch Gefrierbruch-Mikroskopie untersucht, dabei wurden Tight Junctions als Zonen beschrieben, bei denen die Plasmamembranen benachbarter Zellen in engem Kontakt stehen (Farquhar et al. 1963).

Die Tight Junctions bilden im polarisiertem Epithel die apikalsten Elemente des junctionalen interzellulären Komplexes und formen ein kontinuierliches Netzwerk aus leistenförmigen Membrankontakten, in deren Bereich der Interzellulärspalt weitgehend verschlossen ist (Schneeberger 1978). Da transzelluläre Diffusion hauptsächlich für lipophile Substanzen und Gase (Grieb et al. 1985) beschrieben wird, beeinflussen die Tight Junctions durch Verhinderung des parazellulären Flusses in erster Linie den Austausch von hydrophilen Makromolekülen über verschiedene Transporter, Rezeptoren und Enzyme.

Tight Junctions werden hauptsächlich durch zwei verschiedene Klassen von Transmembranproteinen gebildet, Occludin und die mit Occludin eng verwandte Familie der Claudine sowie JAMs (Junctional Adesions Molecules). Letztere gehören zu den Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie. Intrazellulär sind diese Proteine in submembranären Plaques verankert, die aus verschiedenen Proteinen aufgebaut sind und mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts in Verbindung stehen (Abbildung 1).





**Abbildung 1** Die Komponenten der Tight und Adherens Junctions (aus Benninghoff, Anatomie Band 1, modifiziert nach Förster C. 2008).

### 1.1.2.1 Claudine

Claudine sind nicht randomisiert auf die Organe verteilt; gewebespezifische Isoformen bestimmen maßgeblich die Barrierenfunktion unterschiedlicher Epithelien und Endothelien (Furuse et al. 2001). Die Claudine 1, 3, 5 und 12 wurden bislang als Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke charakterisiert (Morita et al. 1999; Nitta et al. 2003; Silwedel et al. 2006). Claudine übernehmen in erster Linie eine wichtige Rolle bei dem Aufbau der parazellulären Schrankenfunktion. Nach Transfektion von Claudin-cDNA in Fibroblasten, die endogen keine Tight Junctions bilden können, war die Ausbildung von Tight Junctions mittels Gefrierbruch-Technik nachweisbar. Die Transfektion von Occludin-cDNA alleine hingegen zeigte nur eine schwache Zell-Zell-Adhäsion

(Kubota et al. 1999), während eine Co-Transfektion von Occludin und Claudin die Integration von Occludin in die durch Claudin formierten Tight Junctions bewirkte (Furuse et al. 1998).

#### 1.1.2.2 Junction-associated adhesion molecules (JAMs)

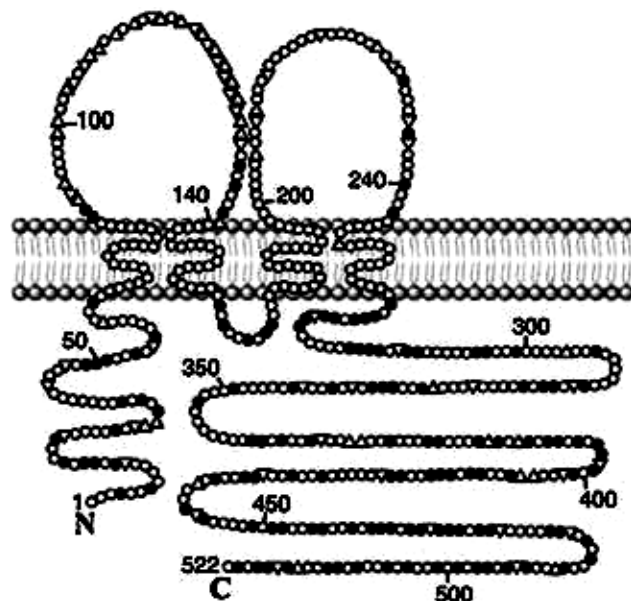
Eine weitere Gruppe der integralen Transmembranproteine sind die Junction-assoziierten Adhäsionsmoleküle (JAM) aus der Immunglobulin-Superfamilie. Bislang sind drei Isoformen beschrieben, die in epithelialen und endothelialen Zellen aber auch in Leukozyten vorkommen (D'Atri et al. 2002). JAM-1 soll an der Transmigration von Monozyten durch das Endothel (Martin-Padura et al. 1998) und an der Regulation des parazellulären Flusses beteiligt sein (Cohen et al. 2001).

#### 1.1.2.3 Zonula occludens (ZO)-Proteine

Die submembranären Zonulae occludens-Proteine ZO-1, -2 und -3 gehören zu der Familie der MAGUK, der membran-assoziierten Guanylatzyklasen (MAGUK) (Itoh et al. 1999). Als Plaque-Proteine im Zytoplasma verbinden sie die Tight Junctions mit dem Aktin-Zytoskelett und könnten so durch Zug über das Aktin-Myosin-System eine kurzzeitige Öffnung der Verschlusskontakte vermitteln (Drenckhahn 2008). Sie haben drei gemeinsame Proteinabschnitte: eine SH3-Domäne, die Signalproteine und Zytoskelettelemente bindet, eine Guanylatzyklase (GUK)-Domäne und schließlich eine PDZ-Domäne, die spezifische Bindungen zu Carboxy-Enden einiger Transmembranproteine vermittelt; so binden Claudine an die PDZ-Domäne (Itoh et al. 1999) ebenso wie JAM-1 (Ebnet et al. 2000), während die GUK-Domäne Occludin bindet (Furuse et al. 1994; Itoh et al. 1999).

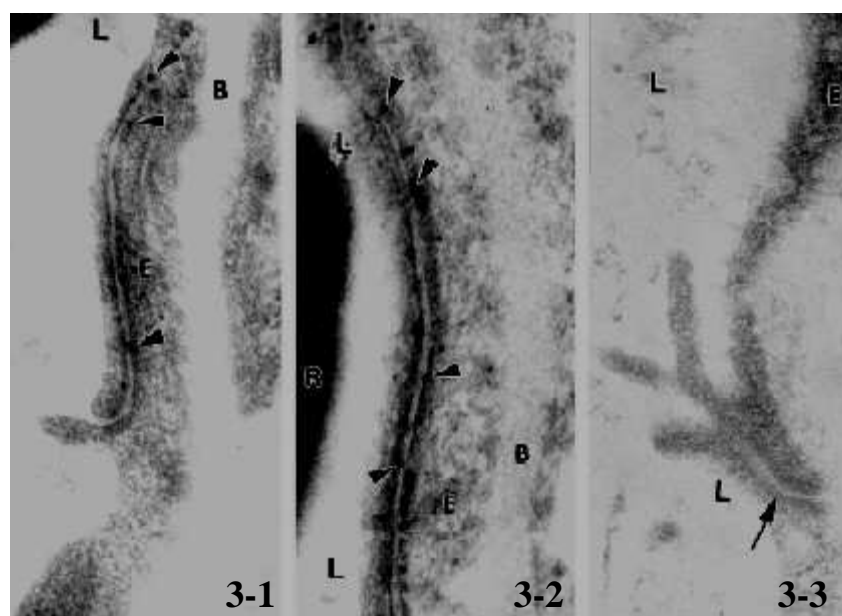
#### 1.1.2.4 Occludin

Occludin wurde als das erste spezifische Tight Junction-Protein identifiziert. Dieses 65 kDa-Membranprotein wurde zuerst in den Tight Junctions des Darmepithels des Huhns charakterisiert und nach dem lateinischen Verb *occludere* (verschließen) benannt (Furuse et al. 1993). Die Abfolge der Aminosäuresequenz ist bei Mensch, Hund und Maus mit einer Übereinstimmung von nahezu 90% sehr ähnlich (Ando-Akatsuka et al. 1996). Das Protein besteht aus zwei extrazellulären Schleifen und vier Transmembrandomänen (Abbildung 2); damit scheint es nahezu die gesamte Strecke des Interzellularspalts zu obliterieren (Tsukita et al. 1998). Der Transmembranbereich sowie die extrazellulären Schleifen und der intrazelluläre C-Terminus sind bedeutend für die Regulation der parazellulären Permeabilität (Balda et al. 2000; Huber et al. 2000). Unabhängig von der Endotheldurchlässigkeit nimmt der N-Terminus Einfluss auf die Transmigration von neutrophilen Granulozyten; nach Veränderung des N-Terminus zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Neutrophilenmigration während der elektrische Widerstand unverändert bleibt (Huber et al. 2000).



**Abbildung 2** Der Proteinaufbau von Occludin  
Occludin besteht aus zwei extrazellulären Schleifen und vier Transmembranbereichen (modifiziert nach Förster C. 2008).

Die Verteilung von Occludin ist keineswegs in den Endothelien unterschiedlicher Gewebe gleich. So ließ sich Occludin weder elektronenmikroskopisch (Vorbrodt et al. 2003) noch biochemisch (Forster et al. 2006) in Endothelzellen von Kapillaren im Herzen oder anderen peripheren Organen nachweisen, während es sowohl in humanen als auch murinen Gehirnkapillaren zu finden ist. Daher kann Occludin als sensibler und verlässlicher Marker von funktionellen Tight Junctions der Blut-Hirn-Schranke angesehen werden (Abbildung 3).



**Abbildung 3** Immunogoldmarkierung von Occludin

Elektronenmikroskopisch zeigt sich die unterschiedliche gewebsspezifische Verteilung von Occludin. Abb. 3-1 zeigt eine murine Gehirnkapillare, bei der sich im Interzellularspalt deutliche Immunogold-Signale finden (Pfeilspitzen), ebenso bei der menschlichen Gehirnkapillare (Abb.3-2). Bei der murinen Herzmuskelkapillare in Abb.3-3 zeigt sich kein Signal zwischen den Endothelzellen (Pfeil) (modifiziert nach Vorbrodt 2003).

Die Expression von Occludin korreliert direkt mit den Permeabilitätseigenschaften der Blut-Hirn-Schranke (Hirase et al. 1997); ebenso beeinflusst es die Permeabilität auch auf epithelialen Barrieren. So steigt der elektrische Widerstand als wichtiger Marker der Barriereintegrität bei Überexpression von Occludin in Nierenepithelzellen (MDCK) deutlich an (McCarthy et al. 1996).

Die Barrierefunktion sowohl epithelial als auch endothelial wird bei vielen Erkrankungen kompromittiert (Feldman et al. 2005, Forster 2008).

Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es häufig zur herabgesetzten Occludin-Expression und damit zu einer erhöhten Permeabilität (Lechner et al. 1999). Beispielsweise gehen entzündliche Darmkrankungen wie Morbus Crohn unter anderem mit einem erniedrigten transepithelialen Widerstand und einer reduzierten Expression von Occludin und Claudin 4 einher (Burgel et al. 2002, Gassler et al. 2001). Auch bei vielen neurologischen Erkrankungen wird die Integrität der Blut-Hirn-Schranke negativ beeinflusst. Bei multipler Sklerose zeigt sich in vivo eine deutlich erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, was mit der diskontinuierlichen Verteilung von Occludin an den Zellgrenzen korreliert (Reichardt et al. 2006). Ähnliche Verhältnisse mit verminderter Occludin-Verteilung sind auch an Hirnendothelzellen bei der HIV-assoziierten Enzephalitis beschrieben worden (Dallasta et al. 1999). Letztlich kann sogar das Altern mit einem absinkenden Occludin-Spiegel in Verbindung gebracht werden (Mooradian et al. 2003).

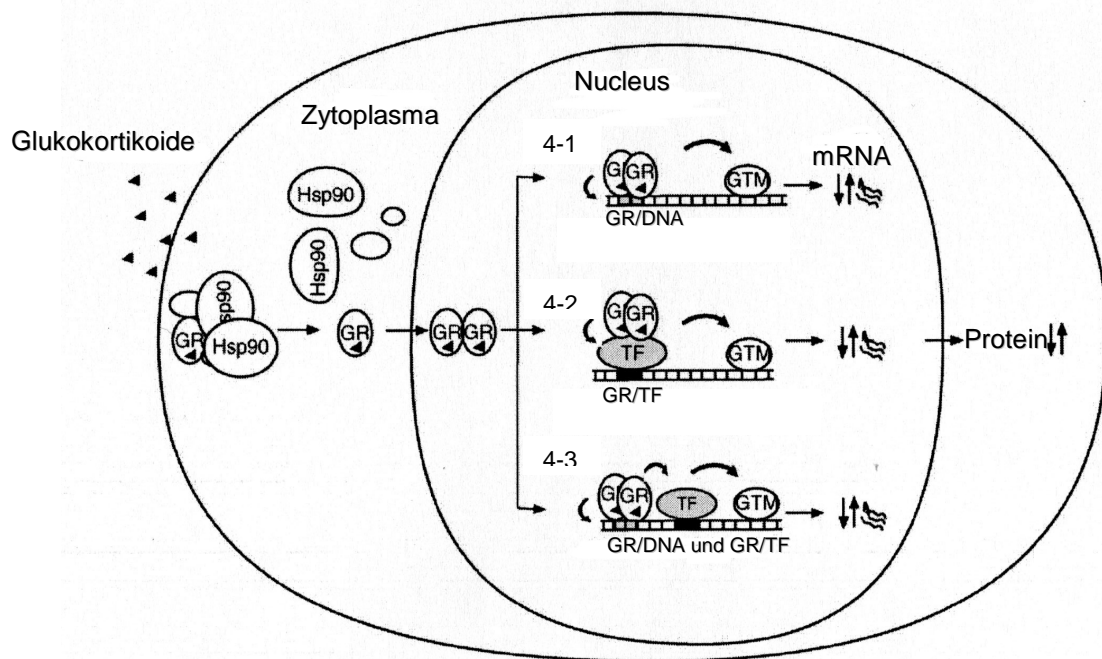
In der Zusammenschau dieser Reduktion von Occludin bei vielen Krankheiten könnte ein therapeutisches Ziel darin bestehen, den Occludin-Spiegel unter pathologischen Umständen positiv zu beeinflussen.

## 1.2 Der Einfluss von Glukokortikoiden auf die Blut-Hirn-Schranke

### 1.2.1 Der Glukokortikoidrezeptor

In vielen klinischen Studien ließ sich der positive Einfluss von Glukokortikoiden auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke nachweisen. Daher ist Kortison schon seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts ein fester Bestandteil des Behandlungskonzepts vieler neurologischer Erkrankungen. Beispielhaft kommt Kortison bei Multipler Sklerose oder nach cerebro-vaskulärem Insult zum Einsatz (Johnson et al. 2005; Qizilbash et al. 2002). Dennoch ist die genaue molekulare Grundlage der Glukokortikoid-Wirkung auf die Endothelbarriere noch nicht komplett aufgeklärt.

Die genomischen Glukokortikoid-vermittelten Effekte beispielsweise von Hydrokortison oder Dexamethason werden durch den Glukokortikoidrezeptor vermittelt (Beato 1989; Beato et al. 2000). Dieser gehört zusammen mit dem Mineralokortikoidrezeptor, Androgenrezeptor und Östrogenrezeptor zu der Familie der Steroidhormonrezeptoren und ist nahezu ubiquitär in allen Zellen exprimiert. In Abwesenheit von Glukokortikoiden ist der Glukokortikoidrezeptor im Zytoplasma an einen Proteinkomplex aus dem Hitzeschockprotein 70 und 90 und zudem an p56 (Yang et al. 1996) gebunden. Nach Ligandenbindung kommt es zu verschiedenen Konformationsänderungen des Rezeptors und somit zu einer Dissoziation des Rezeptors von den Hitzeschockproteinen, gefolgt von einer Translokation in den Zellkern über verschiedene Translokationsproteine (Okamoto et al. 1993). Hier kann der Glukokortikoidrezeptor entweder indirekt über Protein-Protein-Interaktion oder durch Bindung eines Homodimers an die DNA zur Transaktivierung oder Repression von Zielgenen führen (Yudt et al. 2002). Beim klassischen Weg der kanonischen Transaktivierung erkennt und interagiert ein Rezeptor-Homodimer mit spezifischen cis-seitigen Sequenzen innerhalb des Promoters entsprechender Gene, den Glukokortikoid-responsiven Elementen. Der DNA-Rezeptor-Komplex wird des Weiteren durch verschiedene Ko-Aktivatoren stabilisiert, die zur Verstärkung der Gentranskription beitragen (Zhou et al. 2005). Alternativ kann der Rezeptor auch über Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren agieren, wie zum Beispiel bei nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und activator-protein-1 (AP-1). Hier kommt es durch Beeinflussung der Faktoren durch den Glukokortikoidrezeptor zur Suppression der Zielgene, was zur Entzündungsregulation durch Glukokortikoide beiträgt (De Bosscher et al. 2003). Letztlich kann ebenso der Synergismus eines an das Glukokortikoid-responsive Element gebundenen Rezeptors mit anderen Transkriptionsfaktoren bei der Genregulation eine Rolle spielen wie im Falle des Toll-like Rezeptor-2, der bei zeitgleicher Anwesenheit von NF- $\kappa$ B, STAT (signal transduction and activator of transcription) und dem Glukokortikoidrezeptor (Hermoso et al. 2004) induziert wird (Abbildung 4).



**Abbildung 4** Die verschiedenen Wege der Geninduktion durch den Glukokortikoidrezeptor (GR)

Abb. 4-1 zeigt die klassische kanonische Transaktivierung durch ein Glukokortikoid-responsives Element. Abb. 4-2 stellt die Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren dar. Abb. 4-3 zeigt den Synergismus aus klassischer Transaktivierung und Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren. Allen Wegen gemein ist die Aktivierung der Transkription am allgemeinen Transkriptionsstartpunkt (GTM, general transcription machinery) (modifiziert nach Zhou 2005).

### 1.2.2 Die Glukokortikoid-Responsivität des Blut-Hirn-Schranken-Endothels

Klinisch lässt sich eindeutig ein Barriere-erhöhender Effekt von Glukokortikoiden feststellen. So kann die Reduktion der Permeabilität der Gehirnkapillaren schon wenige Stunden nach Kortikosteroidgabe beobachtet werden, was beispielsweise durch Verminderung des Umgebungsödems bei Gehirntumoren zum Ausdruck kommt (Kaal et al. 2004).

Förster et al. (2005) haben ein murines Hirnendothelzellmodell (cEND) etablieren können, anhand dessen man die Glukokortikoid-Responsivität gut nachvollziehen kann. Mit dieser Zelllinie konnte gezeigt werden, dass sich durch die Behandlung mit Hydrokortison in vitro der transendotheliale elektrische

Widerstand als einer der wichtigsten Marker der Barriereintegrität mit  $1000 \Omega\text{cm}^2$  mehr als verdoppelt und sich so den Werten in vivo mit etwa  $2000 \Omega\text{cm}^2$  nähert (Crone et al. 1982).

Zudem konnte Occludin als Zielgen des Glukokortikoidrezeptors bestätigt und weiter charakterisiert werden. Im Westernblot ließ sich eine deutliche Expressionserhöhung von Occludin nach Behandlung kultivierter cEND-Zellen mit Dexamethason in physiologischen Konzentrationen feststellen. Ebenso bestätigten Transaktivierungsstudien die postulierte Glukokortikoid-Responsivität des Occludin-Promoters.

Diese Effekte ließen sich frühestens zwei Stunden nach Glukokortikoid-Behandlung nachweisen, was zusammen mit der Tatsache, dass die Effekte nach Gabe des Glukokortikoid-Antagonisten Mifepristone, RU486, reversibel waren, auf genomische Effekte des Glukokortikoidrezeptors schließen lässt (Forster et al. 2005).



## 2. Zielsetzung

Basierend auf Voruntersuchungen von Förster et al. (2005), die ergaben, dass die Induktion des Tight Junction-Proteins Occludin durch die Gabe von Glukokortikoiden gesteigert wird, stellte sich die Frage nach dem genauen molekularen Mechanismus, wie Glukokortikoide über den Glukokortikoidrezeptor die Transkription des Occludin-Gens initiieren.

Dazu sollte in dieser Arbeit zum einen der Transaktivierungsmechanismus des Glukokortikoids an dem Promoter, zum anderen mögliche Glukokortikoid-responsive Elemente im Occludin-Promoter beschrieben und weiter untersucht werden.

### **Untersuchung des kanonischen Transaktivierungsmechanismus des Glukokortikoidrezeptors**

Der Glukokortikoidrezeptor interagiert über unterschiedliche Wege mit der Ziel-DNA. Der klassische kanonische Transaktivierungsmechanismus mit Bindung an ein Glukokortikoid-responsives Element setzt die Dimerisierung der Rezeptoren voraus. Zum Nachweis dieses klassischen Weges der Transaktivierung des Occludin-Gens wurde die Dexamethason-Responsivität vermittelt durch den Wildtyp-Rezeptor mit der eines dimerisierungsdefizienten Glukokortikoidrezeptors durch einen Promoter-Reporter-Assay verglichen.

### **Charakterisierung putativer Glukokortikoid-responsiver Elemente**

Durch Motivsuche verschiedener etablierter Glukokortikoid-responsiver Elemente und dem Vergleich der Konsensussequenz mit der Sequenz des Occludin-Promoters mit einer Basenpaarlänge von 1853 Bp sollten putative Glukokortikoid-responsive Elemente gefunden werden. Zur Identifikation und Bestätigung dieser Elemente wurden Promoter-Transaktivierungsstudien, Chromatin-Immunpräzipitationsassays und die PCR-vermittelte In-vitro-Mutagenese angewandt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Stratagene, La Jolla
PfuUltra High-Fidelity DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Roth
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Roth
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe

##### 3.1.2 Kits

Effectene Transfection Kit	Qiagen, Hilden
Jetquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Löhne
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Stratagene QuickChange Kit	Stratagene, La Jolla

##### 3.1.3 Chemikalien, sonstige Reagenzien

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampizilin	Invitrogen, Karlsruhe
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bacto-Agar	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bacto-Trypton	Invitrogen, Karlsruhe
Bacto-Yeast	BD Biosciences, Heidelberg
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma, Deisenhofen
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe

Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glukose	AppliChem, Darmstadt
GR $\alpha$ -Antikörper (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz
Hydrocortison	Sigma, Deisenhofen
MEM (Minimum Essential Medium)	Sigma, Deisenhofen
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin 5000IU/ml/5000 $\mu$ g/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Protein-A-Agarose	Calbiochem, Bad Soden
Proteaseinhibitoren	AppliChem, Darmstadt
Aprotinin	
Pepstatin	
Leupeptin	
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth, Karlsruhe
Lachssperma-DNA	Sigma, Deisenhofen
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Roth, Karlsruhe
SSL 100 Bp-Generuler	Fermentas, St. Leon-Roth
Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA 10x-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
3.1.4 Verbrauchsmaterialien	
Einmal-Küvetten	Brand, Wertheim
Kryogefäße	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Nitrilhandschuhe	Ansell Protective Products, Coshocton
Parafilm M	Pechiney Plastic Packing, Menasha

Petrischalen (div. Größen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Plastikpipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plastikreaktionsgefäße (div. Größen)	Eppendorf, Hamburg
Puderfreie Latex-Handschuhe	Kimberly-Clark, Mainz
Glasröhren	Sarstedt, Nürnberg
Spritzen	B.Braun, Melsungen
Sterifilter	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
96-, 12-, 6-Loch-Platten, Petrischalen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (Falcon)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
<b>3.1.5 Geräte</b>	
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Autoklav	Varioklav, Oberschleißheim
Automatikpipetten	Eppendorf, Hamburg
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Heraeus, Hanau
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gelkammern	Invitrogen, Karlsruhe
Heizwasserbad	Haake Messtechnik, Karlsruhe
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Hanna-Instruments, Kehl am Rhein
Lumat LB 9507	Berthold, Bad Wildbad
Magnetrührer L-71	Janke & Kunkel, Staufen
PCR-Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Photometer Smart Spec Puls	BioRad Laboratories, München
Schüttelinkubatoren	B. Braun, Melsungen
Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau

Thermoblock	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Sonifier 250	Benson Ultrasonics. Danbury
UV-Tisch mit UV-Kontaktlampe	Vetter GmbH, Wiesloch
Vakuumsaugpumpe	Heinse Ziller, Würzburg
Vortexer L46	Hartenstein, Würzburg
Waage	Sartorius, Göttingen

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Methoden der Zellkultur

#### 3.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Bei Zelllinien handelt es sich um einen zeitlich unbegrenzt kultivierbaren Zellpopulationstyp; sie entstehen entweder durch Immortalisierung oder stammen von Tumorzellen ab.

##### 3.2.1.1.1 HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen stammen von einer permanenten Linie von humanen embryonalen Nierenzellen nach Transfektion mit dem Adonvirus 5 ab (Graham et al. 1977). Sie lassen sich besonders gut transfizieren.

Die Kultivierung erfolgte in MEM-Medium mit 10% FCS und 100 IU/ml, Penicillin und 100 mg/ml bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Im Abstand von 3-4 Tagen wurden die Zellen nach Ablösen mit Trypsin-Lösung im Verhältnis 1:10 auf eine neue Kulturflasche überführt.

##### 3.2.1.1.2 COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden 1981 aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze gewonnen (*Cercopithecus aethiops*) und stellen eine etablierte Fibroblasten-Zelllinie dar. Die Kultivierung erfolgte analog zu HEK-293-Zellen jedoch mit DMEM-Medium.

#### 3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren erfolgte in MEM mit 20% FCS und 10% DMSO; DMSO diffundiert in die Zellen und verhindert die Bildung von Kristallen während des Einfrierprozesses und so eine potentielle Zerstörung der Zellmembran. Die Zellen wurden in einem Kryoröhrchen mit Einfriermedium versetzt, für einige Tage bei -80°C eingefroren und anschließend zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen mit 37°C warme m Medium aufgetaut und in den entsprechenden Kulturflaschen unter den Standardbedingungen inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium nach Anwachsen der Zellen gewechselt, um das DMSO und abgestorbene Zellen zu entfernen.

### 3.2.1.3 Transiente Transfektion durch Effectene (Qiagen)

Sämtliche transiente Transfektionen wurden mit dem Effectene Kit (Qiagen) durchgeführt, ein System, das auf dem Prinzip der Lipofektion beruht. Hierbei wird im ersten Schritt die DNA durch einen Enhancer (Verstärker) in einem speziellen Puffer kondensiert, um dann durch Zugabe des Effectene-Reagenz Effectene-DNA-Komplexe zu bilden. Durch die dadurch entstehende lipophile Mizellen-Struktur kann die DNA durch die Plasmamembran in die Zellen eindringen.

Ca.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden auf 6-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von ca. 60% transfiziert. 0,4-2 µg Plasmid-DNA wurden mit 140 µl EC-Puffer und 16µl des Enhancers versetzt, für 1 Sekunde gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Effectene hinzu pipettiert, für 10 Sekunden durchmischt und die Probe für 10 Minuten erneut inkubiert. In dieser Zeit wurde das alte Medium der Platte abgesaugt, einmalig mit PBS gewaschen und 1600 µl frisches Medium zugegeben. Nach der Inkubation wurde dem Transfektionsansatz 600 µl Medium zugefügt und das Gemisch in die Zellkulturen überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um mögliche toxische Nebenwirkungen zu reduzieren, und die Zellen anschließend gegebenenfalls mit Hormonen behandelt.

## 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierbei kommt es zu einer Wanderung der negativ geladenen DNA-Fragmente entlang eines elektrischen Feldes.

Zur Herstellung des Gels wurde Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C konnten die Gelkammern befüllt werden. Zum späteren Beladen mit DNA wurde ein Kamm eingesetzt, der nach Erkalten des Gels wieder entfernt wurde. In die so gebildeten Taschen konnte anschließend DNA mit 6x Agarosegel-Probenpuffer gefüllt werden. Hierzu wurde die Gelkammer zunächst in die Elektrophoresekammer mit TBE eingesetzt, so dass das Gel mit TBE bedeckt war. Zur Auftrennung der DNA wurde eine Spannung von 120 Volt angelegt, als Marker der DNA-Fragment-Größe wurde der 100 Bp-Generuler (Fermentas) benutzt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Ethidiumbromid, einer Substanz, die in die DNA interkaliert, für 10 Minuten inkubiert; die DNA konnte so durch UV-Licht sichtbar gemacht werden und gegebenenfalls ausgeschnitten werden.

10 x TBE-Puffer:	108 g Tris 55 g Borsäure 9,3 g EDTA, pH 8,0 ad 1 l H <sub>2</sub> O, mit HCl auf pH 8,3 eingestellt
------------------	--

6 x Agarosegel-Probenpuffer:	0,2 ml 100 mM EDTA, pH 8,0 10 g Glycerin 50 mg Bromphenolblau 50 mg Xylencyanol ad 20 ml H <sub>2</sub> O
------------------------------	---

### 3.2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hierzu wurde die DNA im Verhältnis 1:100 verdünnt und die Absorption gemessen. Die Endkonzentration konnte durch folgende Formel ermittelt werden:



Endkonzentration in ng DNA/ $\mu$ l = Photometrischer Wert x Verdünnung x 50

### 3.2.2.3 DNA-Extraktion

#### 3.2.2.3.1 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch die Gelelektrophorese und anschließender Inkubation mit Ethidiumbromid wurden die gewünschten Banden auf dem UV-Leuchttisch mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Im Anschluss wurde die DNA mit dem Gel-Extraction-Spin-Kit von Jetquick (Genomed) gemäß Anleitung isoliert. Hierfür wurden pro 100  $\mu$ g Gelfragment 300  $\mu$ l der Substanz L1 zur Lösung des Gels zugegeben und für 15 Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert, die Lösung anschließend auf eine Jetquick-Säule aufgetragen und bei 11000 g für eine Minute zentrifugiert, wobei die DNA in der Säule gebunden wird. Nach einem Waschschrift mit 500  $\mu$ l L2-Waschpuffer und erneuter zweimaliger Zentrifugation konnte die DNA mit 50  $\mu$ l TE-Puffer eluiert werden.

#### 3.2.2.3.2 DNA-Extraktion durch Rotiphenol-Fällung

Die Rotiphenol-Fällung dient der Gewinnung von reiner DNA aus einer Suspension.

Zunächst wurde der Probe entsprechend die gleiche Menge an Rotiphenol zugegeben und nach Durchmischung für 3 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Hierdurch bildeten sich drei Phasen, in der oberen die in Aqua dest. gelöste DNA, mittig die Protein-Phase und in der unteren das Rotiphenol. Die oberste Phase wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit absoluten Ethanol dem 2,5-fachen des Ausgangsvolumens entsprechend und einem Zehntel 3M NaOAc (pH 5,2) versetzt. Nach Inkubation bei -20°C über Nacht wurde das Gemisch für 20 Minuten bei 11000 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstehende DNA-Pellet wurde mit 200  $\mu$ l Ethanol gewaschen und das Gemisch für fünf Minuten bei 11000 x g und 4°C zentrifugiert. Die DNA konnte nach Verwerfen des Überstandes und Trocknen des Sediments mit 10  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O resuspendiert werden.

#### 3.2.2.3.3 Mini-Präparation von Plasmiden

Zur DNA-Gewinnung aus eingefrorenen Bakterienkulturen wurde Ampicillin LB-Medium mit erfolgreich transformierten E.coli angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die DNA-Isolation wurde mit dem QIA prep Spin Miniprep Kit (Qiagen) durchgeführt.

Insgesamt 3 ml der Bakterien-Suspension wurden in zwei Zentrifugationsschritten mit 11000 x g für 10 Minuten geerntet. Das entstandene Sediment wurde mit 250 µl 4°C kaltem P1, einem RNase-Puffer, resuspendiert und mit 250 µl NaOH-SDS-P2-Puffer versetzt; letzterer dient der alkalischen Lyse. Nach 5 Minuten wurde die Wirkung des P2 durch Zusatz von 350 µl des Kalium-Acetat-P3-Puffers wieder aufgehoben. Die Zellbestandteile wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 11000 x g sedimentiert und der Überstand mit der DNA auf eine QiaPrep Säule überführt. Im folgenden Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 11000 x g verblieb die DNA im Filter der Säule. Durch Zugabe von 750 µl PE-Puffer und anschließender Zentrifugation mit 11000 x g für zwei Minuten wurde sämtliches Ethanol ausgewaschen. Ein letzter Zentrifugationsschritt mit 50 µl dH<sub>2</sub>O diente der Elution der DNA aus dem Filter der QiaPrep Säule.

#### 3.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können spezifische DNA-Stücke amplifiziert werden. Hierfür benötigt man zwei Einzelstrang-Oligonukleotide (Primer), die jeweils am 5'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz binden.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten: zunächst kommt es zur Hitzedenaturierung der DNA-Doppelstränge mit Temperaturen von 94°C, so dass nur noch Einzelstrang-DNA vorliegt. Nach Abkühlung auf 50-65°C je nach Primer folgt die Annealingphase mit Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-DNA. Im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung (Elongation) der DNA-Abschnitte von den Oligonukleotiden ausgehend durch die entsprechende Polymerase, was letztlich wieder in vollständigen komplementären DNA-

Doppelsträngen resultiert. Diese können nun wiederum als Vorlage für den nächsten Zyklus zur Verfügung stehen.

Die verwendeten Primer (Tabelle 1) wurden von Eurofins-MWG-Operon bezogen und in Aqua dest. gelöst. Taq-Polymerase wurde zur quantitativen Analyse oder zur Amplifizierung kurzer DNA-Sequenzen eingesetzt. Für die DNA-Präparation mit anschließender Subklonierung wie bei pOCLNproLUC\_prox wurde eine Polymerase mit 3'-5'-Proofreading-Aktivität verwendet (Pfu Ultra High Fidelity Polymerase, Stratagene).

#### Ansatz

50 ng	DNA	
5 µl	10x-PCR-Puffer	
1 µl	Primer vorwärts (3' Oligonukleotid (100 pmol/µl)	
1 µl	Primer rückwärts (5' Oligonukleotid (100 pmol/µl)	
1 µl	10mM dNTP-Mix	
0-3 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	
0,5 µl	DNA-Polymerase (5 U/ml)	
ad 50 µl	dH <sub>2</sub> O	
10 x PCR-Puffer mit MgSO <sub>4</sub>		200 mM Tris-HCl (pH 8,8) 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100 mM KCl 20 mM MgSO <sub>4</sub> 1% Triton X-100 1 mg/ml BSA

Dieses Standard-PCR-Programm wurde je nach Primer modifiziert angewandt:

Erst-Denaturierung	94°C	3-5 Minuten	} 25-35 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 Sekunden	
Annealing	45-65°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	1 Minute	
Elongation	72°C	10 Minuten	
Abkühlen	4°C		

Primersequenzen	PCR-Produktgröße	Annealing Temperatur
<u>Klonierung von pOCLNproLUC prox</u>		
F 5'GTAAACCAAGTT	829	47°C
R 5'GCGCTCTGGACCTG		
<u>ChIP distales putatives GRE</u>		
F 5'TGGAATTAGATGGTGGTG	375	53°C
R 5'TGTAGCAATGACTTCCAC		
<u>PCR-vermittelte in-vitro Mutagenese distales putatives GRE</u>		
F 5'GGGAACATTTCCCTAATACTCTCAGATTC TTAAACAAGTGTCTATTATTTTATAATGTA TTTTGAC	65	55°C
R 5'GTCAAATACATTATAAAATAATAGACA CTTGTTTAAGAATCTGAGAGTATTAGGAA ATGTTCCC		

**Tabelle 1** Übersicht der verwendeten PCR-Primer, F = Vorwärts-Primer, R = Rückwärts-Primer

### 3.2.2.5 PCR-vermittelte in-vitro Mutagenese

Um gezielt bestimmte Sequenzen eines Plasmids zu mutagenisieren, kommt die PCR-vermittelte Orts-gerichtete Mutagenese (site directed mutagenesis) mit dem Stratagene QuickChange Kit (Stratagene) zum Einsatz. Hierzu wurden Primer verwendet, die bereits die gewünschten Mutationen enthielten, was zur Amplifikation des gesamten Plasmids mit dem entsprechenden

Basenaustausch im Bereich der Primer führt. Die hierfür benötigten Oligonukleotide hatten eine Länge von 65 Basenpaaren mit den Punktmutationen in der Mitte der Sequenz (Tabelle 1).

Zunächst wurde eine PCR zur Amplifikation des gewünschten mutagenisierten Plasmids durchgeführt, wobei 50 ng des Wildtyp-Plasmids verwendet wurden.

#### Ansatz

5 µl	10x Reaction Buffer
1 µl	DNA (50 ng)
1,25 µl	Primer vorwärts (125 ng)
1,25 µl	Primer rückwärts (125 ng)
1 µl	dNTP-Mix
1 µl	PfuTurbo DNA Polymerase
ad 50 µl	dH <sub>2</sub> O

#### PCR-Protokoll

Denaturierung	95°C	30 Sekunden	} 18 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	
Annealing	55°C	1 Minute	
Elongation	68°C	7 Minuten	
Abkühlen	4°C		

Die Plasmid-DNA, in diesem Fall pOCLNproLUC\_Prox, wurde ursprünglich aus E.coli-Stämmen isoliert und liegt somit methyliert vor. Um das Wildtyp-Plasmid zu verdauen, ohne das neue PCR-Produkt zu schneiden, wurde der Ansatz mit 1µl DpnI, einer Endonuklease, die spezifisch nur methylierte und hemimethylierte DNA angreift, für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde 1µl des Verdauungsansatzes zur Transformation mit 50 µl E.coli-XL1-Blue eingesetzt und die DNA über Minipräparation mit Qiagen wieder gewonnen. Der Mutagenisierungserfolg wurde durch Sequenzierung bestätigt.

### 3.2.2.6 Klonierung von DNA

#### 3.2.2.6.1 Schneiden der DNA durch Restriktionsenzyme

Die DNA, zum einen der Vektor, zum anderen das zu ligierende DNA-Fragment (Insert), wurde getrennt mit je 5 U der Restriktionsenzyme versetzt und mit dem entsprechenden Puffer für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Fall von pOCLNproLUC\_Prox wurde ein sequentieller Verdau angewandt, wobei die Enzyme nacheinander eingesetzt wurden. Im Anschluss an die Inkubation folgte jeweils ein Hitzeinaktivierungsschritt bei 75°C für 10 Minuten.

- Ansatz 1:   8 µl   DNA  
          1 µl   Restriktionsenzym XHO I  
          1 µl   Restriktionspuffer Red Buffer  
          8 µl   dH<sub>2</sub>O
- Ansatz 2:   zu Ansatz 1 wird hinzugefügt:  
          1 µl   Restriktionsenzym Hind III  
          1 µl   Restriktionspuffer Red Buffer

#### 3.2.2.6.2 Ligierung

Zur Ligierung eines Plasmids mit einem DNA-Stück wurde T4-Ligase, die 3'OH-Gruppen mit freien 5'Phosphatgruppen verknüpft, eingesetzt. Der Reaktionsansatz aus aufgereinigtem linearisiertem Vektor, Insert, T4-Ligase und Reaktionspuffer wurde über Nacht bei 13°C inkubiert.

- Ansatz       7 µl   Insert  
              1 µl   Vektor  
              1 µl   10x T4-DNA-Ligase-Puffer  
              1 µl   T4-DNA-Ligase

Der Ligierungsansatz wurde dann in Bakterienstämme transfiziert. Der Ligierungserfolg konnte nach Abschluss der nachfolgenden Schritte über einen Kontrollverdau sichtbar gemacht werden. Hierbei wurden die gleichen Restriktionsenzyme verwendet wie zuvor und der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen; bei positiver Ligation waren der Vektor und das kleinere

eingesetzte DNA-Stück sichtbar. Im Anschluss wurden die erfolgreich ligierten Vektoren sequenziert.

### 3.2.2.6.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Mittels Transformation wird Fremd-DNA in Bakterienzellen, in unserem Fall E.coli XL1-Blue, eingebracht.

100 µl E.coli wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 10 µl des Ligierungsansatzes versetzt und das Gemisch für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 2 Minuten einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und danach wieder auf Eis gesetzt. Nach dem Zusatz von 200 µl LB-Medium ohne Antibiotikum wurde die Suspension auf dem Drehrad für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und im Anschluss auf einer Selektions-Agar-Platte mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB-Agar	10 g NaCl 10 g Bacto-Tryptone 5 g Bacto-Yeast (Casein-Hydrolysat) 15 g Bacto-Agar ad 1 l H <sub>2</sub> O, mit 1 N NaOH auf pH 7 einstellen
LB-Medium	10 g NaCl 10 g Bacto-Tryptone (Casein-Hydrolysat) 5 g Bacto-Yeast ad 1 l H <sub>2</sub> O, mit 1 N NaOH auf pH 7 eingestellt

### 3.2.2.6.4 Einfrieren von E.coli-Stämmen

Zur Herstellung von E.coli-Glyzerinkulturen wurden 200 µl der Bakterienkultur in mit Ampicillin versetztem LB-Medium mit 800 µl Glycerinlösung vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach konnten die Glyzerinkulturen bei -80°C gelagert werden.

Glycerin Lösung	65% Glycerin 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 25 mM Tris pH 8
-----------------	--

### 3.2.2.7 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Spezifische DNA-Bindungsstellen von Kernrezeptoren können mittels ChIP Assay nachgewiesen werden. Durch Bindung eines Antikörpers können DNA-Rezeptor-Komplexe präzipitiert werden, und somit responsive Elemente näher eingegrenzt werden. Es wurde das Protokoll von der Firma Upstate mit einigen Abweichungen verwendet.

Hierfür wurden HEK-293-Zellen in phenolrotfreiem, steroidfreiem MEM-Medium auf 6-Loch-Platten mit einer Zellzahl von ca.  $2 \times 10^5$  ausgesät, am nächsten Tag mit dem Plasmid pOCLNproLUC\_7 (Mankertz et al. 2000) transient transfiziert und 24 Stunden später mit  $1 \mu\text{M}$  Dexamethason behandelt. Am Folgetag wurde zunächst die Bindung zwischen DNA und Rezeptor durch Zugabe von Formaldehyd mit einer Endkonzentration von 1% im Medium bei  $37^\circ\text{C}$  für 10 Minuten stabil quervernetzt (Crosslinking). Danach wurde die Mischung von Formaldehyd und MEM-Medium abgesaugt und die Zellen zweimalig mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Rubber-Policeman abgekratzt und anschließend in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 4 Minuten bei  $5000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  wurde das Sediment mit  $200 \mu\text{l}$  SDS-Lysis-Buffer mit den Proteaseinhibitoren PMSF ( $1 \text{ mM}$ ), Aprotinin ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und Pepstatin A ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Mit dem Benson Sonifier 250 bei Stufe 5 wurde das Chromatin mit acht Ultraschallpulsen in eine Länge von 500-1000 Basenpaare zerkleinert und für 10 Minuten bei  $11000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit  $1800 \mu\text{l}$  ChIP Dilution Puffer und den entsprechenden Proteaseinhibitoren verdünnt.  $100 \mu\text{l}$  dieser Suspension wurden abgesondert und dienen später der Bestimmung der DNA-Ausgangsmenge (Input).

Zur Reduktion des nicht-spezifischen Hintergrunds wurde eine Mischung aus  $90 \mu\text{l}$  Protein-A-Agarose und  $10 \mu\text{l}$  Lachssperma-DNA hinzu gegeben und 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  durchmischt. Nach Abzentrifugieren der Agarose bei  $800 \times g$  für 1 Minute wurde zum Überstand  $5,5 \text{ ng}$  des polyklonalen GR $\alpha$ -



Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) eingesetzt und über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert.

Zur Präzipitation des Komplexes aus DNA, Glukokortikoidrezeptor und Antikörper gegen den Rezeptor wurde am nächsten Tag wiederum Protein-A-Agarose und Lachssperma-DNA zugefügt und 1 Stunde unter Rotation inkubiert. Nach der einminütigen Zentrifugation bei 800 x g wurde die Agarose über verschiedene Schritte mit je 1 ml Puffer für 5 Minuten gewaschen und wiederum zentrifugiert. Zunächst mit Low Salt Immune Complex Wash Puffer, danach mit High Salt Immune Complex Wash Puffer, LiCl Immune Complex Wash Puffer, schließlich wurde die Agarose nochmals zweimal mit TE-Puffer gewaschen, um zur Elution überzugehen. Hierbei wurde 250 µl Elutionspuffer hinzu gegeben und unter Rotation 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang wiederholt. Nach Zusammenführung des Eluats (ca. 500 µl) und Zugabe von 20 µl 5 M NaCl wurde die Quervernetzung durch Hitzeinaktivierung bei 65°C für 4 Stunden beendet. Die Proben wurden bei -20°C eingefroren. Am Folgetag wurde 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1 M Tris-HCl (pH 6,5) und 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) zum Verdau hinzu gegeben, nach der Inkubation bei 45°C für 1 Stunde konnte die DNA durch Rotiphenol-Fällung isoliert und in dH<sub>2</sub>O resuspendiert werden. Im Anschluss konnte die DNA-Menge sowohl vor (Input) als auch nach (Output) Zugabe des Antikörpers durch quantitative PCR ermittelt werden. Im Output findet sich hierbei nur DNA, die ursprünglich an den Rezeptor gebunden war.

SDS Lysis Puffer	1% SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl pH 8
ChIP Dilution Puffer	0,01% SDS 1,1% Triton-X-100 16,7 mM Tris-HCl pH 8 167 mM NaCl 1,2 mM EDTA
Low Salt Immune Complex Wash Puffer	0,1% SDS 1% Triton-X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl
High Salt Immune Complex Wash Puffer	0,1% SDS 1% Triton-X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl pH 8 500 mM NaCl
LiCl Immune Complex Wash Puffer	250 mM LiCl 1% IGEPAL-CA630 1% deoxycholic acid (sodium salt) 1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl
1 x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8 1 mM EDTA
Elutionspuffer	1% SDS, 0,1 M NaHCO <sub>3</sub>

### 3.2.2.8 Transaktivierungsversuche mit dem Dual-Luciferase Assay Kit (Promega)

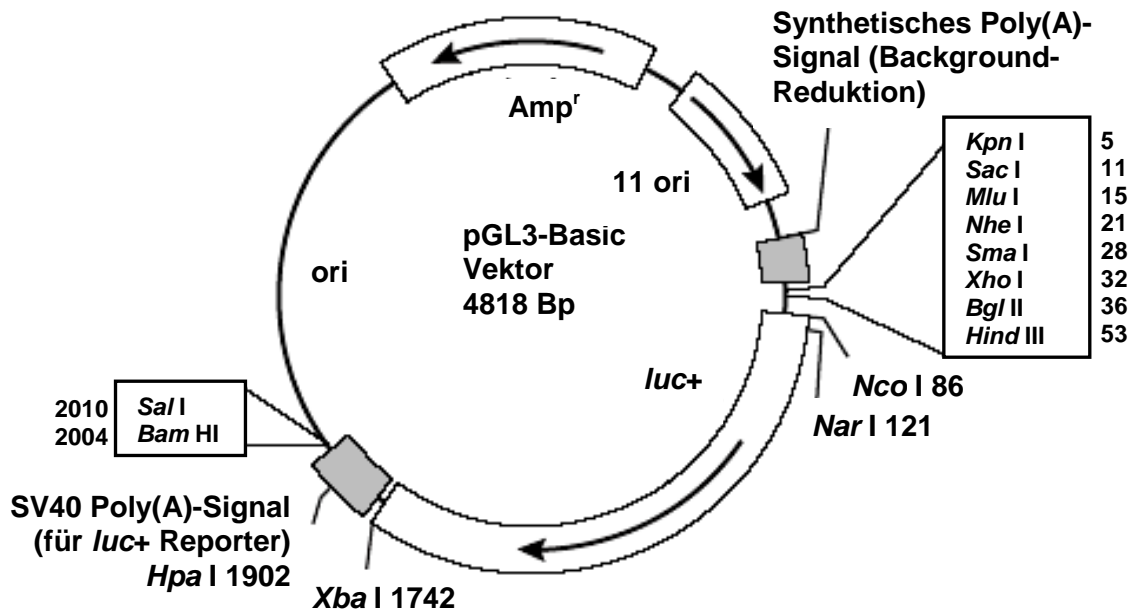
Beim Luciferase Assay dient die aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* gewonnene Firefly-Luciferase als Reporterenzym und Renilla-Luciferase aus *Renilla reniformis* als Kontrollenzym der Transfektionseffizienz.

Das Genprodukt Luciferin wird durch die Firefly-Luciferase in Anwesenheit von Sauerstoff, ATP und Mg<sup>2+</sup> zu Oxyluciferin oxidiert, bei diesem Prozess wird ein Lichtblitz emittiert. Ähnlich kommt es beim Umsatz von Coelenterazin zu Coelenteramid durch die Renilla-Luciferase zur Lumineszenz. Die Menge der

exprimierten Luciferase kann durch Messung der freigesetzten Lichtmenge im Luminometer bei 562 nm ermittelt werden.

Für die Transaktivierungsversuche wurde der pGL3-Vektor (Abbildung 5) mit Firefly-Luciferase mit verschiedenen vorgeschaltene Promotern verwendet, als Kontrollvektor diente der pTRL-TK Vektor (Promega) mit Renilla-Aktivität. 2 µg des entsprechenden pGL3, 1 µg pTRL-TK und, je nach Versuchsaufbau, 0,4 µg verschiedener Glukokortikoidrezeptoren wurden transient in 6-Loch-Platten mit HEK-293- bzw. COS-7-Zellen mit einer Konfluenz von 50-60% transfiziert und am nächsten Tag mit 1 µM Dexamethason in 10% steroidfreiem MEM behandelt. 24 Stunden später wurde die Messung der Transaktivierung durchgeführt. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit je 500 µl Passive Lysis Buffer auf einem Schüttler für 15 Minuten von den Loch-Platten gelöst, um in ein Eppendorf-Gefäß überführt zu werden. Zur Entfernung möglicher Zelltrümmer wurden die Proben für 5 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Analyse genutzt. Die Gesamtprotein-Konzentration wurde durch einen Bradford Protein Assay ermittelt.

Zunächst wurden je 100 µl Luciferase Assay-Reagenz II (LAR II) in Luminometer Röhren vorbereitet und mit 20 µl Zelllysat versetzt. Das Tube wurde dann in den LB9507 Luminometer mit Injektor (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) gesetzt und die erste Messung der Firefly Luciferase initiiert. Durch automatische Zugabe von 100 µl Stop&Glo Reagenz durch den Injektor nach 12 Sekunden wurde die Wirkung von Firefly beendet und zugleich die Renilla Luciferase aktiviert. Sämtliche Messungen wurden zweimal pro Probe durchgeführt. Die Werte der Firefly Luciferase, die relativen Lichtunits (RLU), und somit die Promoteraktivität wurden gegen die Transfektionseffizienz, ermittelt durch Renilla, und die Proteinkonzentration nach Bradford normalisiert.



**Abbildung 5** Aufbau des pGL3-Basic Vektors (modifiziert nach Promega)  
Mit luc+ wird das Kontrollgen beschrieben, diesem kann durch Ligierung ein Promoter unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme vorgeschaltet werden. Zudem findet sich eine Ampicillinresistenz zur Überprüfung des Transfektionserfolgs in die Zielzelle.

### 3.2.2.9 Bradford-Assay

Dieser Assay basiert auf der Methode nach Bradford (Bradford 1976) bei der Proteine durch Coomassie-Brillant-Blau-Bindung photometrisch bei einer Wellenlänge von 590 nm nachgewiesen werden. Für den Bradford-Test wurden 10 µl Proteinlösung und 1 ml Bradford-Reagenz eingesetzt und 10 Minuten inkubiert. Als Referenzprotein wurde eine Standardreihe mit BSA verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die Abhängigkeit der Occludin-Expression von dem Glukokortikoidrezeptor

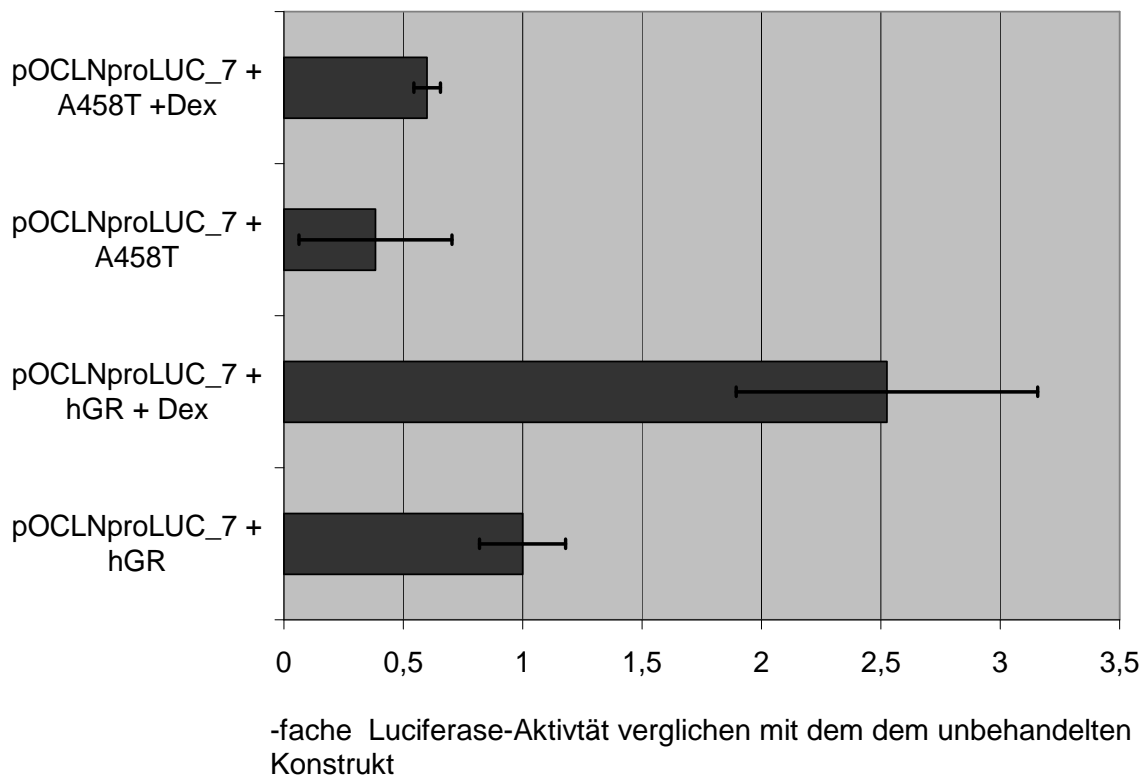
Beim klassischen kanonischen Transaktivierungsmechanismus des Glukokortikoidrezeptors kommt es zur Bindung eines Rezeptordimers an ein spezifisches pentadekamerisches „tandem-repeat“, also einer Anlagerung an ein Glukokortikoid-responsives Element auf der cis-Seite des Zielgens (Beato 1989). Die Möglichkeit zur Ausbildung des Rezeptorhomodimers wird maßgeblich bestimmt durch die D-Schleife in der DNA-bindenden Domäne des Glukokortikoidrezeptors. Die durch die D-Schleife vermittelten Kontakte stabilisieren das Rezeptor-Homodimer und sind für die feste DNA-Bindung wichtig (Dahlman-Wright et al. 1991; Luisi et al. 1991).

Bereits in früheren Studien konnte der Einfluss von Kortikosteroiden auf die Occludin-Expression in einer murinen Gehirndothelzelllinie nachgewiesen werden (Förster et al. 2005). Um nun zu untersuchen, ob dieser Effekt auf eine direkte Bindung des Glukokortikoidrezeptor-Homodimers an die DNA zurückzuführen ist oder Dimerisierungs-unabhängige indirekte Wirkungen auf andere Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, wurden Promoter-Transaktivierungs-Studien durchgeführt mit einem Glukokortikoidrezeptor, dem auf Grund einer Mutation in der D-Schleife die Dimerisierungsfähigkeit fehlt; dieser Rezeptor wird im Folgenden mit A458T bezeichnet (Heck et al. 1994). Im Vorfeld dieser Arbeit wurde zunächst eine Transaktivierung durch den murinen Wildtyp-Glukokortikoidrezeptor nachgewiesen.

Davon ausgehend, dass die Occludin-Gentransaktivierung von einer Dimerisierung des Glukokortikoidrezeptors abhängt, wurde die Induktion des Promoter-Reporter-Gens durch den Dual-Luciferase-Reporter-Assay überprüft. COS-7-Zellen dienten hierbei als Arbeitszellen, da diese endogen den Glukokortikoidrezeptor nicht exprimieren können (Hoeck et al. 1990) und man deshalb bei COS-7-Zellen sicher auf eine Gentransaktivierung durch den transfizierten Glukokortikoidrezeptor schließen kann.

Vergleichbar mit vorherigen Ergebnissen zeigte sich bei der Transfektion von COS-7-Zellen mit dem Volllängen-Promoter-Luciferase-Konstrukt pOCLN-proLUC\_7 (Mankertz et al. 2000) und dem humanen Glukokortikoidrezeptor  $\alpha$  (hGR) nach anschließender Behandlung mit 1  $\mu$ M Dexamethason (Dex) eine Steigerung der Luciferaseexpression um das 2,5-fache ( $\pm 0,7$ ) verglichen mit den unbehandelten Zellen.

Im Gegensatz hierzu ließ sich keine Dexamethason-Responsivität mehr in den COS-7-Zellen nachweisen, die mit dem Dimerisierungs-defizienten Glukokortikoidrezeptor A458T ko-transfiziert wurden (Abbildung 6).



**Abbildung 6** Die Glukokortikoid-vermittelte Transaktivierung des Occludin-Promoter nach Transfektion von hGR und A458T und Behandlung mit Dexamethason.

Eine signifikante Steigerung der Luciferaseexpression ist nur nach Transfektion mit dem humanen Wildtyprezeptor, nicht jedoch mit dem mutierten, Dimerisierungs-defizienten Rezeptor A458T zu beobachten.

Das mangelnde Ansprechen des Occludin-Promoters in der Gegenwart des mutagenisierten A458T-Rezeptors verglichen mit dem Wildtyp-Rezeptor lässt darauf schließen, dass die Glukokortikoid-vermittelten Effekte auf einer direkten kanonischen Bindung des Glukokortikoidrezeptor-Homodimers an ein Glukokortikoid-responsives Element der DNA beruhen.

## 4.2 Glukokortikoid-responsive Elemente des Occludin-Promoters

### 4.2.1 Putative Glukokortikoid-responsive Elemente im Occludin-Promoter

Ein möglicher Weg der Glukokortikoid-vermittelten Occludinexpression ist die direkte Bindung des Glukokortikoidrezeptors an ein cis-seitiges Element im Promoter des entsprechenden Zielgens. Basierend auf bereits beschriebenen Glukokortikoid-responsiven Elementen wurde ein pentadekamerisches unvollkommenes Palindrom als Konsensussequenz identifiziert: 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' (Schoneveld et al. 2004).

Ebenso definierten Nakabayashi et al. 2001 das Glukokortikoid-responsive Element als DNA-Abschnitt bestehend aus sechs Nukleotiden in einer repetitiven Sequenz, einem so genannten palindromischen Tandem-Repeat, getrennt durch drei unspezifische Nukleotide: TCYTGTnnnACARGA (Nakabayashi et al. 2001).

Im proximalen DNA-Abschnitt des Occludin-Promoters fanden sich jedoch keine kanonischen Sequenzen, die der Konsensussequenz ähneln.

Beim Vergleich anderer Glukokortikoidrezeptor-Bindungsstellen fällt allerdings die große Variabilität der Position der Nukleotide auf (Nakabayashi et al. 2001; Chen et al. 2003; Pascussi et al. 2003). So konnte durch Heranziehen anderer untypischer Sequenzen und abweichender Glukokortikoid-reponsiver Elemente aus der Literatur ein putatives stark degeneriertes Konsensusmotiv abgeleitet werden: HHNKGHnnnHCMNNW (H=A/C/T; W=A/T; K=T/G; M=A/C) (Tabelle 2).

Glukokortikoid-responsives Element	Gen	Referenz
NCNTGT ... <b>ACANG</b>	Somatostatin-Rezeptor	Nakabayashi et al. 2001
TCCTGT ... <b>ACAACG</b> CAATGT ... <b>ACAAGA</b>	Ratten Aldehyd-Dehydrogenase	Chen et al. 2003
TCNTGT ... <b>ACANGA</b>	Ratten Alpha-Fetoprotein	Pascussi et al. 2003
CCTTGT ... TCCCGT <b>ACGGAA</b> ... <b>ACAAGG</b>	Androstan-Rezeptor	Kraus et al. 1999
<b>ACTTGA</b> ... <b>ACAAAA</b> TTTTGT ... TCAAGT	CYP2C19	Falkner et al. 1999
TCGCGT ... <b>ACACGT</b> <b>ACAGGC</b> ... CCAAGT <b>ACATGT</b> ... <b>ACAAGA</b>	Ratten Na+K+-ATPase beta 1	Adcock 2001; Hao et al. 2003
<b>ACATGT</b> ... <b>ACAACA</b>	CYP2C9	Gerbai-Chaloin et al. 2002

**Tabelle 2** Literaturanalyse bereits beschriebener Glukokortikoid-responsiver Elemente

Innerhalb des verwendeten Voll-Promoter-Konstrukts mit 1853 Basenpaaren und dem Transkriptionsstartpunkt des humanen Occludin-Gens (Mankertz et al. 2000) ließen sich zwei Sequenzen homolog zu dem Konsensusmotiv entdecken. Eines an Position -1492 bis -1507 5'-ACATGTGTTTACAAAT-3' (distales putatives Glukokortikoid-responsives Element), ein Zweites an Position -537 bis -522 5'-CAAATGTTTACACACGA-3' (proximales putatives Glukokortikoid-responsives Element) (Abbildung 7).



ATTATGCTAAGTGAAAGAAGACAGACACAAAGGGCACATATTGTATTATCCATTTCATATAAAAATGTCCAG 70  
 AATAGGCAAATTAATAGAGACAGAAAAGTACATTAGTGGTTGCCGAGGGATGAGGGGAGAGGGGAAATGGG 140  
 GAGTGACTATTAATGGGCATGGGGTTTCTTTTGGGGGCGATTAAAATGGAATTAGATGGTGGTGATGGTT 210  
 GTACAATCTGGTGAGTATACTAAAACCCATTGAATTGTACGTGCCCTTAAAAGGGTGAATTTTATGGTA 280  
 TGTGAACTCTCTTTTATAAAGTGGAAAAAACTCCTAAGATCTCTTCAGAACATGTCAAAATACATTATA 350  
 AAATAATAG**ACATGT**GTTT**ACAAAT**CTGAGAGTATTAGGAAATGTTCCCTTGTTTAATTATAAACCAAAT 420  
     **distales putatives GRE**  
 GGAATGTTTGGAGATTTTCAGTAATCTGACAGGGAAACATTAAGGGGATTAACCTGACTTCCCCAGTGTTAA 490  
 CAATACCAATTTAAACTGCATCATTCAAAAACACTACATAGTCATATTAAGCATTGTAGCAATGACTTCC 560  
 ACGAAAAAATACCAATTAATTAATTACCCATTAAGCTGCCATCATCTGAAATACCTCATATTTATAT 630  
 AGTGCTTTTACTTCCCTCAAGTATGAATTGTGCCTTAAGATCTAATGTATGGGAGAGTCACATCTCTAACC 700  
 ATTTAATTAAGGTAGAGAAGTGGGTGGGATTGGATAGAAATTTATTAGCAATGCTGACATTCCAGATTG 770  
 GAACACAAAGACAAGCAGGATGTAAGAAACCTAAAAGTTTCGCTTTCATGCAGATAGTTAAATGCCAAGA 840  
 ACTATAATTGCCACATCCTGGAGTACAATTAAAAAATATGTTGAAAAACAACCAACATACATAAAAATAT 910  
 ACACAGTGTTAAGTGCAGACTATGAAATTTCCCTTGGAAACAGAATCCAGATCAAGAAATAGAATACAGC 980  
 ACCCGGAACTAAGGTGCTTTTTTCGTTTTCTTAAAAAAGTAAACCAAGTTTATTTTGTCTTTTTAA 1050  
 GTAGTGTTGTTCTTAAAGCACTACAGGTTGGTAAACAACGTATAAGGTGCTTTTTTCTCAGGCCAAAGAGC 1120  
 CATAATAGTTTAAATTTCCCGTCTCAAGAGCGGACCGGGTGGGCAGGAGAGGACCCTGGGGTGGTGAT 1190  
 GTGTAAACTGTATTATGCACTTTAGCCTGCTGGATGGCAACTAACACCTACAGTAGTTCACCCTCATTTT 1260  
 AACCCCTCTAAGTAATTGTCTCTTATTTCTGAATCTAGAGATTCAGAAACAGCGC**CAATGTTTACACACGA** 1330  
     **proximales putatives GRE**  
 CTTTTGAAATTTTCCAGGAGTCTTTCGTTGGAGCAATACATCTAGATGCCTTTTTCCAGCAACAGTTTA 1400  
 ATCAAATTTCTGGAAGCAGAAAAGTGTCTGTGAGGACGTGCCTTTCCTATCAAAGTGCTGAGTGCCCTGGA 1470  
 CCCTCTTCCGGAGGAAACAGTCCCTCTGGACCTCGTTCGGCCTCTCTCCATCAGACACCCCAAGGTTT 1540  
 CATCCGAAGCAGGCGGAGCACCGAACGCACCCCGGGTGGTCAGGGACCCCATCCGTGCTGTCCCTTAG 1610  
 GAGCCCGCCTCTCCTCTGCGCCCCGCTCTCGGGCCGCAACATCGCGGGTTCCTTTAACAGTGCCT 1680  
 GGCAGGGTGTGGGAAGCAGGACCGGTCTCCCGCCCCCTCCCATCCGAGTTTCAGGTGAATTGGTCACC 1750  
 GAGGGAGGAGGCCACACACCACCTACACTCCCGCTCCACCTCTCCCTCCCTGCTTCTCTGGCGGA 1820  
 GGCGGCAGGAACCGAGAGCCAGGTCCAGAGCGC 1853

**Abbildung 7** Mögliche Glukokortikoid-responsive Elemente im menschlichen Occludin-Promoter (Proximaler Promoterabschnitt) (modifiziert nach Mankertz 2000)

## 4.2.2 Lokalisation des Glukokortikoid-responsiven Elements

### 4.2.2.1 Promoter-Reporter-Gen-Assay

Zur Überprüfung der Funktionalität der beiden putativen Glukokortikoid-responsiven Elemente wurde die Dexamethason-Responsivität des Volllängen-Occludin-Promoters (pOCLNproLUC\_7) der des proximalen Promoteranteils gegenüber gestellt.

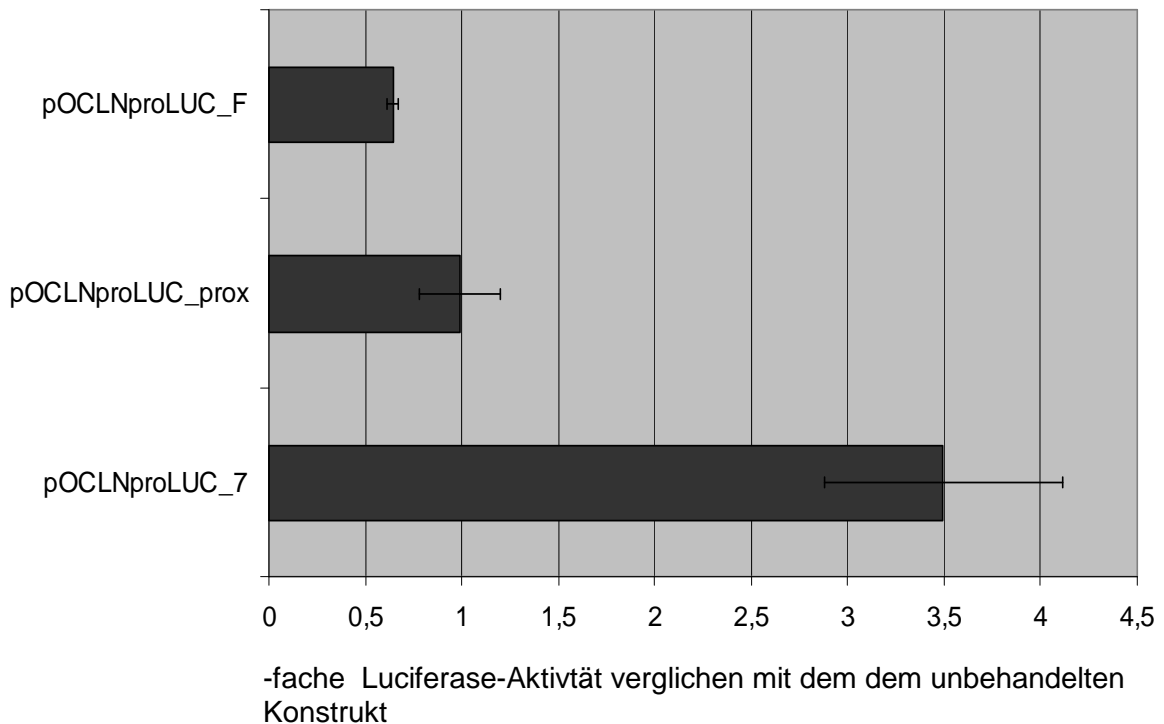
Daher wurde zunächst der proximale Occludin-Promoterabschnitt mit einer Länge von 859 Basenpaaren inklusive des proximalen putativen Glukokortikoid-responsiven Elements und des Transkriptionsstartpunkts in einen pGL3-Basic-Vektor (Promega) subkloniert (pOCLNproLUC\_Prox).

Die Transaktivierung durch pOCLNproLUC\_Prox wurde mit der durch pOCLNproLUC\_7, dem Vollpromoter mit beiden putativen Elementen, und pOCLNproLUC\_F als Minimalpromotor verglichen. pOCLNproLUC\_F enthält 280 Basenpaare des Occludin-Promoters, wovon 208 Basenpaare direkt stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegen (Mankertz et al. 2000), dieser Vektor enthält somit kein Glukokortikoid-responsives Element.

Mittels Dual-Luciferase-Reporter-Assay ließ sich das unterschiedliche Ansprechen der einzelnen Konstrukte gut nachweisen. Zunächst wurden die Vektoren separat in HEK-293-Zellen transfiziert, eine humane Zelllinie, die auf die Behandlung mit Glukokortikoiden mit einer erhöhten Glukokortikoidrezeptor-Expression reagiert. 24 Stunden später erfolgte die Inkubation mit 1  $\mu$ M Dexamethason, so dass am nächsten Tag der Luciferase-Assay durchgeführt werden konnte.

Entsprechend früherer Ergebnisse von Förster et. al. (2005, 2006) zeigte pOCLNproLUC\_7 als Volllängenpromoter mit beiden putativen Sequenzen nach Dexamethason-Behandlung eine Erhöhung der Transaktivierung um das 3,4-fache ( $\pm 0,6$ ). Im Gegensatz hierzu fand sich keine entsprechende Reporter-gen-Induktion bei pOCLNproLUC\_Prox (1,0-fache  $\pm 0,3$ ). Ebenso konnte bei dem Minimalpromoter pOCLNproLUC\_F den Erwartungen

entsprechend keine Dexamethason-Responsivität nachgewiesen werden (0,6-fache  $\pm$  0,1) (Abbildung 8).



**Abbildung 8** Luciferaseaktivität als Ausdruck der Luciferaseexpression durch Transaktivierung des Occludin-Promoters nach Behandlung mit 1  $\mu$ M Dexamethason im Vergleich zum unstimulierten Vektor. Hierbei wurde die Responsivität verschiedener Promoterabschnitte mittels Luciferase-Reporter-Untersuchung verglichen.

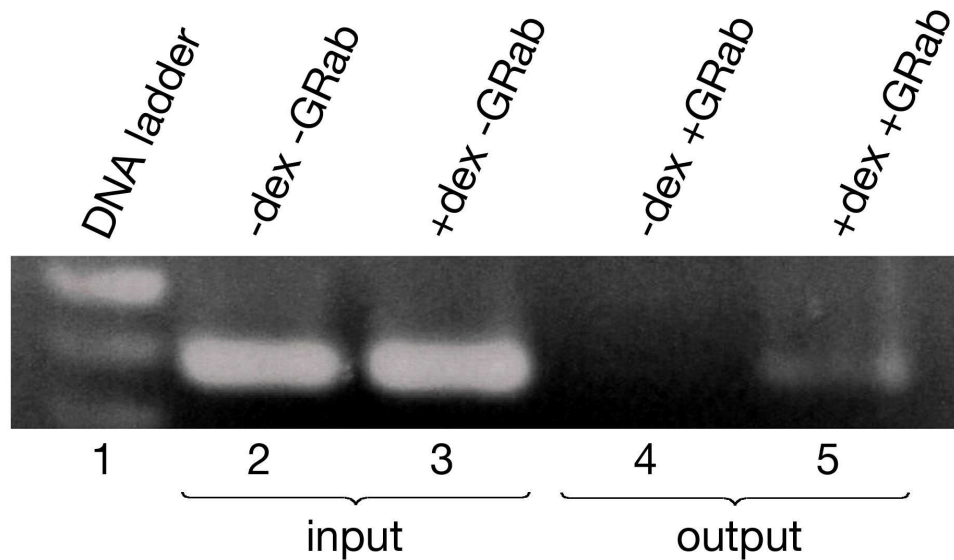
Da der proximale Anteil des Occludin-Promoters scheinbar nicht auf die Behandlung mit Dexamethason ansprach, der Vollpromoter jedoch mit einer erhöhten Transaktivierung reagierte, konnte man von einem möglichen Glukokortikoid-responsiven Element im distalen Promoterbereich ausgehen.

#### 4.2.2.2 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Um diesen Bereich im distalen Promoter auf das putative distale Glukokortikoid-responsive Element weiter einzugrenzen, wurde mit dem ChIP Assay nach einer möglichen Glukokortikoidrezeptor-Bindungsstelle gesucht. Die verwendeten Primer amplifizierten einen DNA-Abschnitt von Position -1666 bis -1291, in dessen Mitte das distale putative Glukokortikoid-responsive Element lag.

HEK-293-Zellen wurden mit dem Vektorkonstrukt pOCLNproLUC\_7 transfiziert und für 24 Stunden mit 1  $\mu$ M Dexamethason behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Bindung des Glukokortikoidrezeptors an die DNA mittels Quervernetzung mit Formaldehyd stabilisiert, anschließend wurde das Chromatin durch Ultraschall in Stücke von 500-1000 Basenpaaren unterteilt und der Antikörper gegen den Glukokortikoidrezeptor (GRab) hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurde der Komplex aus DNA, Glukokortikoidrezeptor und Rezeptor-Antikörper durch Protein-A-Agarose präzipitiert, so dass im Endprodukt (Output) nur DNA befand, die ursprünglich an den Rezeptor gebunden war. Die DNA-Menge konnte dann durch eine quantitative PCR bestimmt werden.

Bei ähnlichen DNA-Ausgangsmengen vor der Antikörperfällung (Input) ließ sich nach Präzipitation (Output) nur DNA in den Proben finden, die zuvor mit Dexamethason behandelt wurden, während man kein Signal bei den unbehandelten Zellen finden konnte. Dies sprach für eine Rezeptor-Bindungsstelle innerhalb der untersuchten 375 Basenpaare und deutete erneut auf das putative distale Glukokortikoid-responsive Element hin (Abbildung 9).

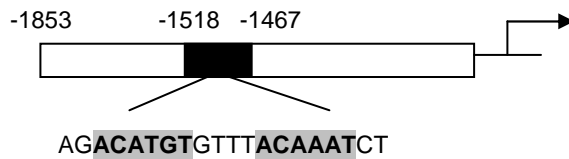


**Abbildung 9** Chromatin-Immunopräzipitationsassay der behandelten und unbehandelten pOCLNproLUC\_7-Proben.

#### 4.2.2.3 PCR-vermittelte in-vitro Mutagenese

Um die Funktionalität des putativen distalen Glukokortikoid-responsiven Elements nun endgültig bestätigen zu können, wurde eine PCR-vermittelte in-vitro-Mutagenese durchgeführt. Hierzu wurden vier Mutationen auf der DNA des humanen Occludin-Promoter-Konstrukts pOCLNproLUC\_7 an Positionen initiiert, die maßgeblich für die Bindung des Glukokortikoidrezeptors sind (Schoneveld et al. 2004). Hierbei wurden auch sämtliche so genannte Wobble-Basen berücksichtigt, um die zufällige Bildung einer alternativen Rezeptor-Bindungsstelle zu vermeiden. Das mutagenisierte Konstrukt wurde als pOCLNproLUC\_Mut bezeichnet (Abbildung 10).

## Wildtyp-GRE

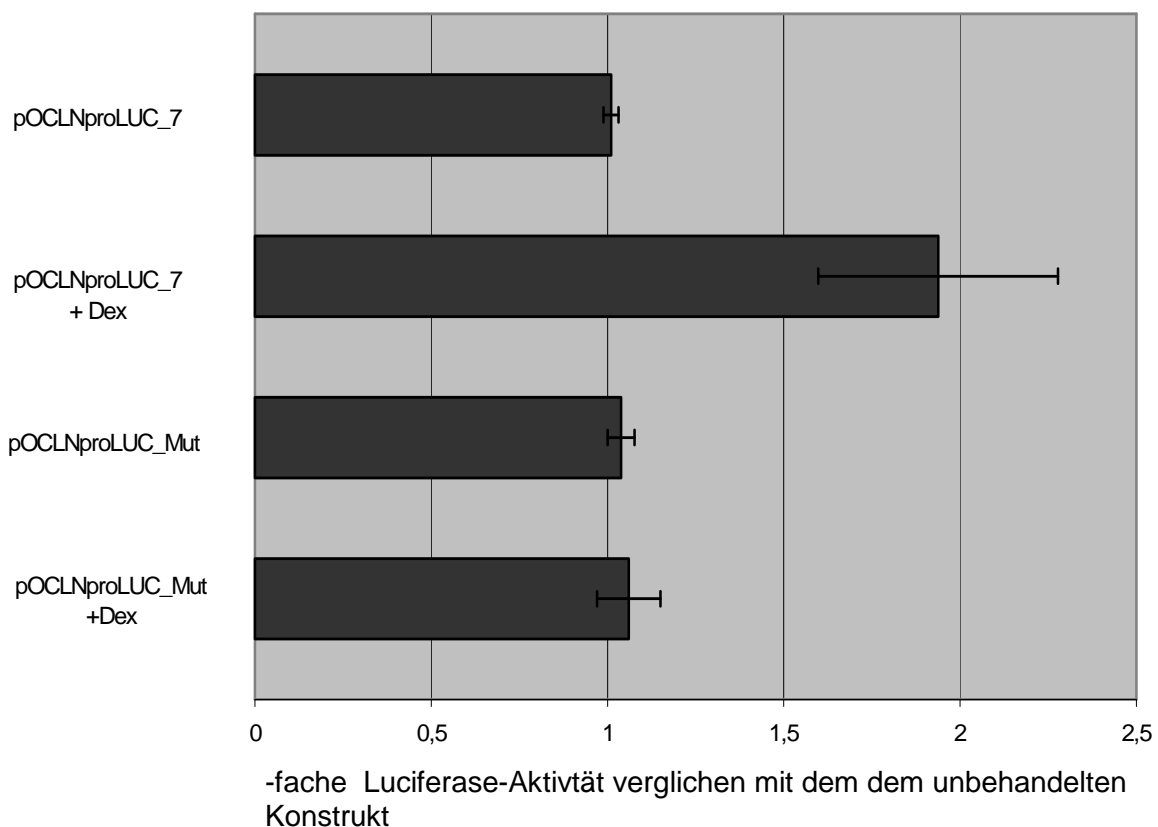


## Mutagenisiertes putatives GRE



**Abbildung 10** Mutagenisierung des möglichen Glukokortikoid-responsiven Elements durch PCR-vermittelte-Mutagenese

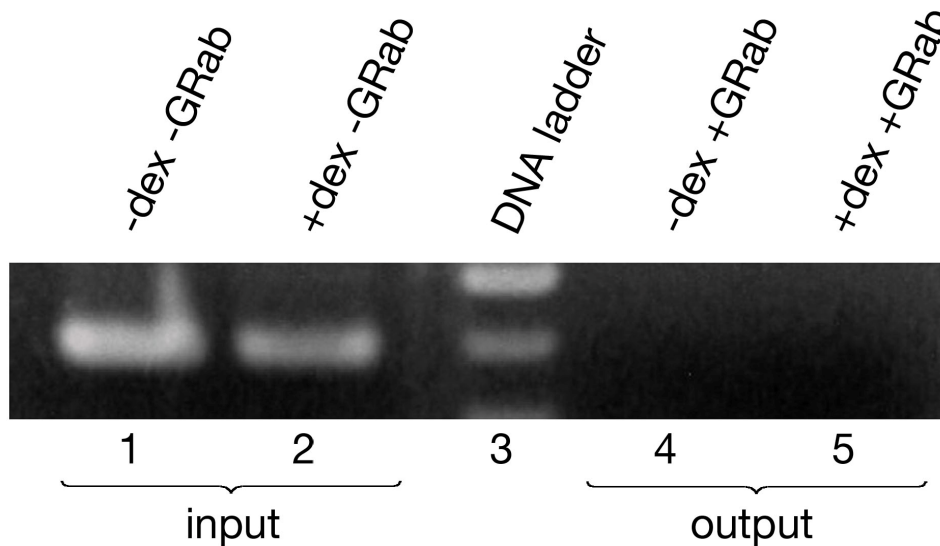
Anschließend wurde das Ansprechen von pOCLNproLUC\_Mut auf die Behandlung mit Dexamethason geprüft. Sowohl der humane Occludin-Promoter pOCLNproLUC\_7 als auch die mutagenisierte Variante pOCLNproLUC\_Mut wurden in HEK-293-Zellen transient transfiziert und diese anschließend mit 1 µM Dexamethason inkubiert. Im Dual-Luciferase-Reporter-Assay zeigte sich für pOCLNproLUC\_7 ähnliche Ergebnisse wie in den vorherigen Untersuchungen mit einer Erhöhung der Induktion des Reportergens um das 1,99-fache ( $\pm 0,34$ ). Bei pOCLNproLUC\_Mut ließ sich jedoch keine Steigerung des Transaktivierungspegels durch Dexamethason feststellen; die Werte mit 1,06 ( $\pm 0,09$ ) ähnelten denen der unbehandelten Proben (Abbildung 11).



**Abbildung 11** Vergleichende Transaktivierungsstudie mit dem mutagenisierten Vektor pOCLNproLUC\_Mut und dem Wildtyp pOCLNproLUC\_7. Nach Behandlung mit Dexamethason findet sich nur beim Wildtyp-Promoter eine erhöhte Induktion.

Die Tatsache, dass die Dexamethason-Stimulation die Genexpression im mutagenisierten Vektor nicht beeinflusste, bestätigte die Funktionalität des distalen putativen Glukokortikoid-responsiven Elements und zugleich, dass die Rezeptorbindung nach Veränderung der Sequenz nicht mehr möglich ist. Um letzteres nochmals zu bestätigen, wurde erneut ein Chromatin-Immunopräzipitationsassay durchgeführt, diesmal mit pOCLNproLUC\_Mut. Gemäß dem Standardprotokoll wurden wiederum HEK-293-Zellen mit pOCLNproLUC\_Mut transfiziert und mit 1  $\mu$ M Dexamethason stimuliert. Der Antikörper gegen den Glukokortikoidrezeptor wurde anschließend zugefügt. In der quantitativen PCR ließ sich diesmal im Gegensatz zu dem starken Output-Signal des humanen Wildtyp-Promoters keine DNA nachweisen, was darauf

schließen ließ, dass es nach Mutagenisierung des putativen Elements nicht mehr zu einer Bindung des Rezeptorhomodimers kommen kann (Abbildung 12).



**Abbildung 12** ChIP-SSA der behandelten und unbehandelten mutagenisierten pOCLNproLUC\_Mut-Konstrukte. Nach Mutagenisierung des putativen Glukokortikoid-responsiven Elements lässt sich auch nach Dexamethason-Stimulation keine DNA nachweisen.



## 5. Diskussion

### 5.1 Der Einsatz von Glukokortikoiden im klinischen Alltag

Seit dem ersten therapeutischen Einsatz in den späten vierziger Jahren des letzten Jahrhunderts sind Glukokortikoide ein Hauptfokus vieler endokrinologischer Studien. Auch heute noch ist die Behandlung mit Kortison ein wichtiger Bestandteil der Therapie bei vielen neurologischen Erkrankungen, die teilweise mit einer herabgesetzten Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke vergesellschaftet sind.

Unter anderem spielen Glukokortikoide eine wichtige Rolle im Behandlungskonzept von Multipler Sklerose. Hierbei werden sie vor allem in der akuten Schubtherapie eingesetzt bei insgesamt mangelndem nachhaltigen Effekt auf den Krankheitsverlauf durch Hoch-Dosis-Kortison-Therapie (Reichardt et al. 2006). Möglicherweise kann ein besseres Verständnis des molekularen Mechanismus der Glukokortikoid-Wirkung zur Entwicklung neuer, verbesserter Behandlungsschemata beitragen.

Förster et al. haben anhand einer murinen Gehirnzelllinie deutlich den barriereverdichtenden Effekt von Glukokortikoiden zeigen können und eine von der Glukokortikoiddosis abhängige Induktion des Tight junction-Proteins Occludin nachgewiesen; diese Veränderungen korrelierten mit einem erhöhten transendothelialen Widerstand und einer herabgesetzten Permeabilität des Endothels.

### 5.2 Die Gentransaktivierung durch direkte Rezeptor-DNA-Bindung

Glukokortikoide kontrollieren und beeinflussen eine Vielzahl von physiologischen Prozessen über unterschiedliche molekulare Mechanismen. Für die Regulation der Gentranskription binden Glukokortikoide an einen Glukokortikoidrezeptor im Zytoplasma der Zielzelle, was zur Translokation in den Zellkern und zu einer konsekutiven Interaktion des Rezeptors mit einem Promoter des Zielgens führt (Kumar et al. 2005). Die anschließende

Genexpression wird entweder durch direkte Bindung eines Rezeptorhomodimers an ein Glukokortikoid-responsives Element des Promoters (Beato 1989) vermittelt oder alternativ durch Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren durch Protein-Protein-Interaktion ohne vorherige Rezeptor-Dimerisierung (Gottlicher et al. 1998). Die Unterscheidung zwischen den beiden Transaktivierungswegen wurde durch die Entwicklung eines Glukokortikoidrezeptors ermöglicht, der auf Grund einer Punktmutation in der Dimerisierungsdomäne nicht mehr direkt an der DNA binden kann (Kumar et al. 2005).

Der Glukokortikoidrezeptor hat spezifische funktionale und strukturelle Bereiche. Innerhalb der DNA-Bindungsdomäne ist die P-Box nötig für die Erkennung eines Glukokortikoid-responsiven Elements, während die D-Box an der Dimerisierung des Proteins beteiligt ist (Kumar et al. 2005). Die DNA-Bindungsdomäne kann sich nicht selbst dimerisieren, dieser Prozess wird durch Bindung an cis-seitige Sequenzen des Zielgens als allosterischer Faktor initiiert (Schoneveld et al. 2004). Der Austausch der Aminosäure Alanin durch Threonin in der D-Schleife des zweiten Zinkfingers des Rezeptors führt zu einem Dimerisierungs-defizienten Protein, das nicht mehr an die DNA binden kann; somit beruht eine nachfolgende Glukokortikoid-vermittelte Gentransaktivierung auf Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Faktoren (Heck et al. 1994; Reichardt et al. 1998).

In früheren Arbeiten konnte bereits der Einfluss von Glukokortikoiden auf die Expression des Tight Junction-Proteins Occludin verdeutlicht werden (Förster et al. 2005, 2006). Bislang wurde jedoch die direkte Bindung an ein Glukokortikoid-responsives Element des Occludin-Promoters als Initiator der Geninduktion nicht gesichert, zudem ließen sich keine etablierten Bindungsstellen in der Literatur finden. Durch den Vergleich der Occludin-Induktion vermittelt durch einen Wildtyp-Glukokortikoidrezeptor und durch einen Dimerisierungs-defizienten Rezeptor (Reichardt et al. 1998) ließ sich der kanonischen Transaktivierungsmechanismus für Occludin bestätigen.

### 5.3 Das degenerierte Glukokortikoid-responsive Element im Occludin-Promoter

Eine allgemeine Konsensussequenz wurde basierend auf einer Anzahl von Glukokortikoid-responsiven Elementen definiert als ein pentadekamerisches Palindrom mit der Sequenz 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' (Nordeen et al. 1990), innerhalb dessen das 3'-Halbelement fixiert ist, während der 5'-Bereich ein höheres Maß an Flexibilität zeigt (Schoneveld et al. 2004). Der Platzhalter mit drei Basenpaaren wurde als strikte Voraussetzung für die kanonische Bindung des Rezeptor-Homodimers an das entsprechende Element beschrieben (Dahlman-Wright et al. 1991).

Mittels Sequenz-Analyse und Transaktivierungsstudien verschiedener Occludin-Promoterabschnitte unterschiedlicher Länge ließ sich ein funktionelles, degeneriertes Glukokortikoid-responsives Element im distalen Occludin-Promoteranteil bei Position -1507 und -1492 identifizieren. Promoter-Reporter-Untersuchungen mit transienter Transfektion eines 1852 Basenpaare umfassenden Promoterabschnitts, der einem Luciferase-Gen vorgeschaltet war, bestätigte, dass ein responsives Element innerhalb der distalen Promoterregion vorliegt. Die Bindung des Rezeptors an diesen DNA-Abschnitt wurde durch eine Chromatin-Immunopräzipitation von Glukokortikoidrezeptor-DNA-Komplexen (Wang et al. 2004) verifiziert. Zur genauen Lokalisierung und Bestätigung wurde das putative Element mittels PCR-vermittelte in-vitro-Mutagenese verändert (Pascussi et al. 2003; Gerbal-Chaloin et al. 2002). Die ausbleibende Occludin-Induktion bestätigte das Vorliegen eines Glukokortikoid-reponsiven Elements an Position -1507 und -1492. Diese pentadekamerische Sequenz enthält ein asymmetrisches degeneriertes Glukokortikoid-responsives Element, das zuvor nicht beschrieben wurde (Wang et al. 2004).

Dieses Element weicht an Position  $\pm 6 - \pm 4$  von der Konsensussequenz ab, ist aber symmetrisch an Position  $\pm 1 - \pm 3$ . Obwohl es sich stark von der Konsensussequenz unterscheidet, können physiologische Effekte beobachtet werden. Zudem deuten verfügbare Daten in diesem Zusammenhang darauf hin, dass Glukokortikoidrezeptoren unter physiologischen Bedingungen eine hohe Selektivität und Affinität für DNA haben, die nur teilweise symmetrische

Glukokortikoid-responsive Elemente beinhalten. Diese hohe Affinität für abweichende Bindungsstellen kann für die selektive Regulation der Genexpression in Glukokortikoid-responsiven Zellen ausreichen (Tully et al. 1990).

Es finden sich in der Literatur verschiedene responsive Elemente, die von der Konsensussequenz abweichen, ohne an Funktionalität zu verlieren. Mehrere Bindungsstellen für den Glukokortikoidrezeptor mit unterschiedlicher Struktur und Sequenz sind bereits etabliert und werden als so genannte sekundäre Glukokortikoid-responsive Elemente mit verzögerter Glukokortikoidantwort definiert (Chan et al. 1991; Welte et al. 1993). Diese repräsentieren Verbindungen von Halbelementen mit irregulärer Platzhalterlänge und befinden sich sowohl im Promoter des Alpha-Globulin-Gens als auch bei den Milchprotein-Genen Weizen-Protein und Beta-Kasein (Chan et al. 1991; Welte et al. 1993). Die Autoren weisen allerdings auf die Wichtigkeit spezifischer zellulärer Faktoren hin, die die Bindung beziehungsweise Transaktivierung des Promoters durch den Glukokortikoidrezeptor unterstützen. Die Anwesenheit und Notwendigkeit solcher möglicherweise gewebsspezifischen Faktoren muss für die Induktion von Occludin noch weiter geklärt werden. Der Mechanismus und die Art der Gentranskription - als Induktion oder Repression - werden maßgeblich beeinflusst von der Sequenz und Architektur des responsiven Elements und der Verfügbarkeit und Aktivität der regulierenden Faktoren an diesem Element (Rogatsky et al. 2003).

Interessanterweise ließ sich ein weiteres asymmetrisches putatives Glukokortikoid-responsives Element im Occludin-Promoter an Position -537 und -552 detektieren. Dieses zeigte jedoch keine Bindung des Rezeptors, so dass dessen Transaktivierung möglicherweise die Interaktion des Glukokortikoidrezeptors mit anderen Transkriptionsfaktoren im zellulären Kontext benötigt (Reichardt et al. 2006). Zudem enthält der humane Occludin-Promoter weitere kanonische Halbelemente (Förster et al. 2005), die allerdings alleine nicht zur Bindung des Rezeptorhomodimers und damit zur Geninduktion befähigt sind.

Weiterhin ist die Rolle verschiedener funktioneller Konfigurationen des Rezeptors bei der Genregulation unklar. Dies hat vermutlich Auswirkungen auf die weitere Suche nach responsiven Elementen, nach der Zusammensetzung und Struktur der regulatorischen Einheiten und den Mechanismen der Kontext-spezifischen Regulation.

## 6. Zusammenfassung

Die Blut-Hirn-Schranke wird hauptsächlich vom Endothel der Hirngefäße gebildet und stellt die wichtigste Barriere zwischen Blutkompartiment und Hirnparenchym dar. Hauptverantwortlich für die Barrierefunktion der Gehirnkapillaren sind die Tight Junctions, die den Interzellularrspalt des Endothels verschließen und dadurch die parazelluläre Permeabilität hydrophiler Moleküle und Ionen regulieren und einen hohen elektrischen Widerstand aufbauen. Das 65 kDa Transmembranprotein Occludin ist ein zentrales Element der Tight Junctions: Eine Induktion von Occludin führt zur Erhöhung der Barriereeigenschaften, während eine Erniedrigung des Occludin-Gehaltes zu einer verstärkten Kapillardurchlässigkeit und potenziell zu einer Schädigung des Hirngewebes führt.

Im klinischen Alltag werden bereits seit vierzig Jahren Kortikosteroide bei Erkrankungen mit geschädigter Blut-Hirn-Schranke erfolgreich eingesetzt. Auch experimentell konnte im hiesigen Labor durch die Arbeitsgruppe von Prof. Förster eine Transaktivierung von Occludin durch Glukokortikoide wie Dexamethason nachgewiesen werden. Die zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen der Occludintransaktivierung blieben weitgehend unbekannt, insbesondere die Frage, ob die Geninduktion über direkte Zielgenstransaktivierung oder über eine Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren erfolgt. Das Vorhandensein putativer Glukokortikoid-responsiver Elemente innerhalb des Occludin-Promoters war ebenso noch nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass für die erhöhte Occludin-Expression in Endothelzellen von Hirngefäßen durch Glukokortikoide ein funktioneller Glukokortikoid-Rezeptor als Homodimer nötig war. In den Experimenten wurden die jeweiligen Transaktivierungsniveaus des Occludin-Promoters durch einen Luciferase-Promoter-Reporter-Assay verglichen. Es wurden zum einen der Wildtyp-Glukokortikoidrezeptor, zum anderen ein mutagenisierter Rezeptor eingesetzt, dem die entscheidende Dimerisierungseigenschaft fehlt. Ohne die Ausbildung eines Rezeptor-

Homodimers kann die Bindung an die Promoter-DNA nicht erfolgen. Im Vergleich zeigte sich, dass nur der Wildtyp-Glukokortikoidrezeptor zu einer erhöhten Genexpression führte, der mutagenisierte Rezeptor zeigte keine Induktion.

Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Bindungsstelle des Glukokortikoidrezeptors auf dem Occludin-Promoter identifiziert werden. Die Identifizierung des Glukokortikoid-responsiven Elements erfolgte durch Untersuchung der Glukokortikoid-Responsivität verschiedener Abschnitte des Occludin-Promoters. Auf zwei dieser Abschnitte fanden sich Gensequenzen, die der etablierten kanonischen Konsensussequenz und verschiedenen in der Literatur beschriebenen degenerierten Elementen entsprachen. Im Promoter-Reporter-Assay zeigte sich nur im distalen Promoterabschnitt eine erhöhte Occludin-Expression nach Glukokortikoid-Gabe. Dieses distale Element aus zwei Halbelementen (5'-ACATGTnnnnACAAAT-3') wurde durch Immunpräzipitationsassays weiter eingegrenzt. Eine Mutagenisierung der Basenabfolge mit anschließend ausbleibender Transaktivierung und Immunpräzipitation bestätigte die Funktionalität des Glukokortikoid-responsiven Elements.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals die direkte dimerisierungsabhängige Glukokortikoidrezeptor-vermittelte Induktion von Occludin nachgewiesen und ein neues degeneriertes Glukokortikoid-responsives Element identifiziert werden, das für die Transaktivierung des Occludingens essentiell ist.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adcock, I. M.** (2001). "Glucocorticoid-regulated transcription factors." Pulm Pharmacol Ther **14**(3): 211-9.
- Ando-Akatsuka, Y., Saitou, M., Hirase, T., Kishi, M., Sakakibara, A., Itoh, M., Yonemura, S., Furuse, M. und Tsukita, S.** (1996). "Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues." J Cell Biol **133**(1): 43-7.
- Balda, M. S., Flores-Maldonado, C., Cerejido, M. und Matter, K.** (2000). "Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability." J Cell Biochem **78**(1): 85-96.
- Beato, M.** (1989). "Gene regulation by steroid hormones." Cell **56**(3): 335-44.
- Beato, M. und Klug, J.** (2000). "Steroid hormone receptors: an update." Hum Reprod Update **6**(3): 225-36.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Burgel, N., Bojarski, C., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. und Schulzke, J. D.** (2002). "Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis." Gastroenterology **123**(2): 433-43.
- Chan, G. C., Hess, P., Meenakshi, T., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J. A. und Payvar, F.** (1991). "Delayed secondary glucocorticoid response elements. Unusual nucleotide motifs specify glucocorticoid receptor binding to transcribed regions of alpha 2u-globulin DNA." J Biol Chem **266**(33): 22634-44.
- Chen, Y., Ferguson, S. S., Negishi, M. und Goldstein, J. A.** (2003). "Identification of constitutive androstane receptor and glucocorticoid receptor binding sites in the CYP2C19 promoter." Mol Pharmacol **64**(2): 316-24.
- Cohen, C. J., Shieh, J. T., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T. und Bergelson, J. M.** (2001). "The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15191-6.
- Crone, C. und Olesen, S. P.** (1982). "Electrical resistance of brain microvascular endothelium." Brain Res **241**(1): 49-55.



- D'Atri, F. und Citi, S.** (2002). "Molecular complexity of vertebrate tight junctions (Review)." Mol Membr Biol **19**(2): 103-12.
- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J. A. und Carlstedt-Duke, J.** (1991). "Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids." J Biol Chem **266**(5): 3107-12.
- Dallasta, L. M., Pisarov, L. A., Esplen, J. E., Werley, J. V., Moses, A. V., Nelson, J. A. und Achim, C. L.** (1999). "Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis." Am J Pathol **155**(6): 1915-27.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. und Haegeman, G.** (2003). "The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression." Endocr Rev **24**(4): 488-522.
- Ebnet, K., Schulz, C. U., Meyer Zu Brickwedde, M. K., Pendl, G. G. und Vestweber, D.** (2000). "Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1." J Biol Chem **275**(36): 27979-88.
- Falkner, K. C., Xiao, G. H., Pinaire, J. A., Pendleton, M. L., Lindahl, R. und Prough, R. A.** (1999). "The negative regulation of the rat aldehyde dehydrogenase 3 gene by glucocorticoids: involvement of a single imperfect palindromic glucocorticoid responsive element." Mol Pharmacol **55**(4): 649-57.
- Farquhar, M. G. und Palade, G. E.** (1963). "Junctional complexes in various epithelia." J Cell Biol **17**: 375-412.
- Feldman, G. J., Mullin, J. M. und Ryan, M. P.** (2005). "Occludin: structure, function and regulation." Adv Drug Deliv Rev **57**(6): 883-917.
- Forster, C.** (2008). "Tight junctions and the modulation of barrier function in disease." Histochem Cell Biol **130**(1): 55-70.
- Forster, C., Silwedel, C., Golenhofen, N., Burek, M., Kietz, S., Mankertz, J. und Drenckhahn, D.** (2005). "Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system." J Physiol **565**(Pt 2): 475-86.
- Forster, C., Waschke, J., Burek, M., Leers, J. und Drenckhahn, D.** (2006). "Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific." J Physiol **573**(Pt 2): 413-25.

- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. und Tsukita, S.** (2001). "Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells." J Cell Biol **153**(2): 263-72.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. und Tsukita, S.** (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." J Cell Biol **123**(6 Pt 2): 1777-88.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. und Tsukita, S.** (1998). "A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts." J Cell Biol **143**(2): 391-401.
- Gassler, N., Rohr, C., Schneider, A., Kartenbeck, J., Bach, A., Obermuller, N., Otto, H. F. und Autschbach, F.** (2001). "Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **281**(1): G216-28.
- Gerbal-Chaloin, S., Daujat, M., Pascussi, J. M., Pichard-Garcia, L., Vilarem, M. J. und Maurel, P.** (2002). "Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor." J Biol Chem **277**(1): 209-17.
- Gottlicher, M., Heck, S. und Herrlich, P.** (1998). "Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action." J Mol Med **76**(7): 480-9.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R.** (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Grieb, P., Forster, R. E., Strome, D., Goodwin, C. W. und Pape, P. C.** (1985). "O<sub>2</sub> exchange between blood and brain tissues studied with 18O<sub>2</sub> indicator-dilution technique." J Appl Physiol **58**(6): 1929-41.
- Hao, H., Rhodes, R., Ingbar, D. H. und Wendt, C. H.** (2003). "Dexamethasone responsive element in the rat Na, K-ATPase beta1 gene coding region." Biochim Biophys Acta **1630**(2-3): 55-63.
- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. und Cato, A. C.** (1994). "A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1." EMBO J **13**(17): 4087-95.
- Hermoso, M. A., Matsuguchi, T., Smoak, K. und Cidlowski, J. A.** (2004). "Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression." Mol Cell Biol **24**(11): 4743-56.

- Hirase, T., Staddon, J. M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S. und Rubin, L. L.** (1997). "Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells." J Cell Sci **110 ( Pt 14)**: 1603-13.
- Hoeck, W. und Groner, B.** (1990). "Hormone-dependent phosphorylation of the glucocorticoid receptor occurs mainly in the amino-terminal transactivation domain." J Biol Chem **265(10)**: 5403-8.
- Huber, D., Balda, M. S. und Matter, K.** (2000). "Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils." J Biol Chem **275(8)**: 5773-8.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. und Tsukita, S.** (1999). "Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins." J Cell Biol **147(6)**: 1351-63.
- Itoh, M., Morita, K. und Tsukita, S.** (1999). "Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin." J Biol Chem **274(9)**: 5981-6.
- Johnson, L. N. und Morey, S. S.** (2005). "Repeated intervals of high-dose corticosteroid: an overlooked therapy in multiple sclerosis." Mo Med **102(1)**: 47-50.
- Kaal, E. C. und Vecht, C. J.** (2004). "The management of brain edema in brain tumors." Curr Opin Oncol **16(6)**: 593-600.
- Kniesel, U. und Wolburg, H.** (2000). "Tight junctions of the blood-brain barrier." Cell Mol Neurobiol **20(1)**: 57-76.
- Kraus, J., Woltje, M. und Holtt, V.** (1999). "Regulation of mouse somatostatin receptor type 2 gene expression by glucocorticoids." FEBS Lett **459(2)**: 200-4.
- Kubota, K., Furuse, M., Sasaki, H., Sonoda, N., Fujita, K., Nagafuchi, A. und Tsukita, S.** (1999). "Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions." Curr Biol **9(18)**: 1035-8.
- Kumar, R. und Thompson, E. B.** (2005). "Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship." J Steroid Biochem Mol Biol **94(5)**: 383-94.

- Lechner, J., Krall, M., Netzer, A., Radmayr, C., Ryan, M. P. und Pfaller, W.** (1999). "Effects of interferon alpha-2b on barrier function and junctional complexes of renal proximal tubular LLC-PK1 cells." Kidney Int **55**(6): 2178-91.
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. und Sigler, P. B.** (1991). "Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA." Nature **352**(6335): 497-505.
- Mankertz, J., Tavalali, S., Schmitz, H., Mankertz, A., Riecken, E. O., Fromm, M. und Schulzke, J. D.** (2000). "Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma." J Cell Sci **113** ( Pt 11): 2085-90.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. und Dejana, E.** (1998). "Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration." J Cell Biol **142**(1): 117-27.
- McCarthy, K. M., Skare, I. B., Stankewich, M. C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R. A., Lynch, R. D. und Schneeberger, E. E.** (1996). "Occludin is a functional component of the tight junction." J Cell Sci **109** ( Pt 9): 2287-98.
- Mooradian, A. D., Haas, M. J. und Chehade, J. M.** (2003). "Age-related changes in rat cerebral occludin and zonula occludens-1 (ZO-1)." Mech Ageing Dev **124**(2): 143-6.
- Morita, K., Sasaki, H., Fujimoto, K., Furuse, M. und Tsukita, S.** (1999). "Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis." J Cell Biol **145**(3): 579-88.
- Nakabayashi, H., Koyama, Y., Sakai, M., Li, H. M., Wong, N. C. und Nishi, S.** (2001). "Glucocorticoid stimulates primate but inhibits rodent alpha-fetoprotein gene promoter." Biochem Biophys Res Commun **287**(1): 160-72.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M. und Tsukita, S.** (2003). "Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice." J Cell Biol **161**(3): 653-60.
- Nordeen, S. K., Suh, B. J., Kuhnel, B. und Hutchison, C. D.** (1990). "Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element." Mol Endocrinol **4**(12): 1866-73.

- Okamoto, K., Hirano, H. und Isohashi, F.** (1993). "Molecular cloning of rat liver glucocorticoid-receptor translocation promoter." Biochem Biophys Res Commun **193**(3): 848-54.
- Pascussi, J. M., Busson-Le Coniat, M., Maurel, P. und Vilarem, M. J.** (2003). "Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element." Mol Endocrinol **17**(1): 42-55.
- Petty, M. A. und Lo, E. H.** (2002). "Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation." Prog Neurobiol **68**(5): 311-23.
- Qizilbash, N., Lewington, S. L. und Lopez-Arrieta, J. M.** (2002). "Corticosteroids for acute ischaemic stroke." Cochrane Database Syst Rev(2): CD000064.
- Reichardt, H. M., Gold, R. und Luhder, F.** (2006). "Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." Expert Rev Neurother **6**(11): 1657-70.
- Reichardt, H. M., Kaestner, K. H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. und Schutz, G.** (1998). "DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival." Cell **93**(4): 531-41.
- Rogatsky, I., Wang, J. C., Derynck, M. K., Nonaka, D. F., Khodabakhsh, D. B., Haqq, C. M., Darimont, B. D., Garabedian, M. J. und Yamamoto, K. R.** (2003). "Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 13845-50.
- Schneeberger, E. E.** (1978). "Structural basis for some permeability properties of the air--blood barrier." Fed Proc **37**(11): 2471-8.
- Schoneveld, O. J., Gaemers, I. C. und Lamers, W. H.** (2004). "Mechanisms of glucocorticoid signalling." Biochim Biophys Acta **1680**(2): 114-28.
- Silwedel, C. und Forster, C.** (2006). "Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli." J Neuroimmunol **179**(1-2): 37-45.
- Tsukita, S. und Furuse, M.** (1998). "Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin." Genes Cells **3**(9): 569-73.

- Tully, D. B. und Cidlowski, J. A.** (1990). "Affinity of interactions between human glucocorticoid receptors and DNA: at physiologic ionic strength, stable binding occurs only with DNAs containing partially symmetric glucocorticoid response elements." Biochemistry **29**(28): 6662-70.
- Vorbrodt, A. W. und Dobrogowska, D. H.** (2003). "Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view." Brain Res Brain Res Rev **42**(3): 221-42.
- Wang, J. C., Derynck, M. K., Nonaka, D. F., Khodabakhsh, D. B., Haqq, C. und Yamamoto, K. R.** (2004). "Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(44): 15603-8.
- Welte, T., Philipp, S., Cairns, C., Gustafsson, J. A. und Doppler, W.** (1993). "Glucocorticoid receptor binding sites in the promoter region of milk protein genes." J Steroid Biochem Mol Biol **47**(1-6): 75-81.
- Yang, J. und DeFranco, D. B.** (1996). "Assessment of glucocorticoid receptor-heat shock protein 90 interactions in vivo during nucleocytoplasmic trafficking." Mol Endocrinol **10**(1): 3-13.
- Yudt, M. R. und Cidlowski, J. A.** (2002). "The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene." Mol Endocrinol **16**(8): 1719-26.
- Zhou, J. und Cidlowski, J. A.** (2005). "The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses." Steroids **70**(5-7): 407-17.

## 8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Drenckhahn für die Bereitstellung des Themas. Sein Enthusiasmus, sein Interesse und seine Offenheit haben mich sehr beeindruckt, er diente mir damit nicht nur wissenschaftlich als Vorbild.

Ich möchte mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Förster bedanken, die mich während der langen Zeit unermüdlich und mit viel Eifer betreut hat. Besonders die letzten Jahre waren durch eine konstruktive Zusammenarbeit geprägt, die mich wissenschaftlich deutlich voran gebracht hat. Bei ihr hatte ich die Freiheit neue Ideen auszuprobieren, um dann den eingeschlagenen Weg gemeinsam mit ihr zu überprüfen.

In ihrer Arbeitsgruppe mit Kinga Blecharz, Gosia Burek und Eva-Maria Klute habe ich immer die nötige Unterstützung technischer aber auch persönlicher Art gefunden, auch hierfür danke ich.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Waschke für die offene Tür, ihn konnte man stets um Rat fragen. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Kugler danken, dessen wundervoll amüsanter und lehrreicher Präparationskurs mir den ersten Einblick in die spannende Welt der Anatomie gegeben hat. Er hat mich letztlich inspiriert, meine Doktorarbeit in der Anatomie zu verfassen.

Vielen Dank an die Friedrich-Ebert-Stiftung, die mich während des Studiums und der Promotionsphase finanziell und ideell unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern Beate und Wolfgang danken, die mich während der ganzen Zeit mit viel Herzblut unterstützt haben. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet, sicherlich haben sie sich den Abschluss der Promotion fast noch mehr herbei gewünscht als ich.

## 9. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Geboren am 13. April 1982 in Bad Brückenau  
Nationalität Deutsch  
Familienstand Ledig  
Anschrift Wallgasse 1/2  
97070 Würzburg

### AUSBILDUNG

1992 – 2001 Franz-Miltenberger-Gymnasium, Bad Brückenau, Deutschland  
Allgemeine Hochschulreife  
2001 – 2008 Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Deutschland  
Studiengang Humanmedizin  
2003 Physikum (Ärztliche Vorprüfung)  
2008 2. Ärztliche Prüfung und Approbation zur Ärztin

### STUDIENBEGLEITENDE PRAKTIKA

#### Famulaturen

März 2004 Franz-von-Prümmer-Klinik, Bad Brückenau, Deutschland  
Sechs Wochen Innere Medizin und Chirurgie  
Aug 2004 Franz-von-Prümmer-Klinik, Bad Brückenau, Deutschland  
Vier Wochen Chirurgie  
Sep 2005 McGill University, Montreal, Kanada  
Vier Wochen Emergency Medicine  
März 2006 Universitätsklinik, Würzburg, Deutschland  
Zwei Wochen Urologie  
  
Praktisches Jahr  
Aug 2006 Universitätsklinik, Würzburg, Deutschland  
Acht Wochen Unfall- und Wiederherstellungschirurgie  
Okt 2006 University of Louisville, Louisville, USA  
Vier Wochen General Surgery, vier Wochen Trauma Service/  
Burn Unit  
Dez 2006 Universitätsklinik, Würzburg, Deutschland  
14 Wochen Urologie  
April 2007 Spital Rorschach, Rorschach, Schweiz  
15 Wochen Innere Medizin

### BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Sept 2008 Missionsärztliche Klinik, Würzburg, Deutschland  
Assistenzärztin in der Urologie  
seit Nov 2009 Missionsärztliche Klinik, Würzburg, Deutschland  
Assistenzärztin in der Chirurgie

Würzburg, Dezember 2009

Nina Natascha Harke