

**Aus dem Physiologischen Institut  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. M. Kuhn**

**Biolumineszenz Resonanz Energietransfer (BRET) zur Untersuchung der  
Dimerisierung des Mineralokortikoidrezeptors**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Lisa Marie Langenbruch  
aus Münster**

**Würzburg, 2010**

**Referent: Prof. Dr. E. Wischmeyer**  
**Korreferent: Priv.-Doz. Dr. M. Fassnacht**  
**Dekan: Prof. Dr. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2011**

**Die Promovendin ist Ärztin.**

## Inhaltsverzeichnis

Aus dem Physiologischen Institut .....	
Inhaltsverzeichnis .....	
1. Einleitung .....	1
1.1 Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor .....	1
1.2 Biolumineszenz Resonanz Energietransfer .....	4
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	6
2. Material und Methoden .....	7
2.1 Klonierung der Plasmide .....	7
2.1.1 pRluc-MR .....	7
2.1.2 Sequenzierung: .....	8
2.1.3 pEYFP-MR .....	8
2.2 Zellkultur .....	9
2.3 Überprüfung der Funktionalität der Fusionsproteine .....	9
2.3.1 SEAP-Reporter-Assay .....	9
2.3.2 MR-Transaktivierungsaktivität in Abhängigkeit von der DNA-Menge.....	11
2.3.3 SEAP-Interaktions-Assay .....	11
2.3.4 Bestimmung der subzellulären Lokalisation des EYFP-MR durch Fluoreszenzmikroskopie .....	12
2.4 Nachweis des EYFP-MR mittels Western Blot.....	13
2.5 Stabile Transfektion von HEK Zellen mit pRluc-MR bzw. pRluc .....	14
2.6 Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET) .....	14
2.6.1 Messung des BRET .....	14
2.6.2 BRET in transient transfizierten Zellen.....	15
2.6.3 BRET in stabil transfizierten Zellen.....	15
2.7 Proteinbestimmung mittels Bicinchononic Acid (BCA)-Reaktion: .....	16
2.8 Statistik .....	16
2.9 Materialien.....	16
3. Ergebnisse.....	18
3.1 Funktionelle Charakterisierung des EYFP-MR.....	18
3.2 Funktionelle Charakterisierung des Rluc-MR.....	19
3.3 Interaktion von Rluc-MR mit EYFP-MR und His-GR .....	20
3.4 BRET .....	23
3.4.1 BRET in transient transfizierten Zellen.....	23
3.4.2 BRET in stabil transfizierten Zellen.....	23
3.4.3 Untersuchung des Korrekturfaktors $C_f$ .....	24
3.4.4 Bestimmung der DNA-Menge für die Transfektion.....	26
3.4.5 Effekt von Aldosteron, Geldanamycin und Spironolacton.....	27
4. Diskussion .....	29
4.1 Die Fusionsproteine EYFP-MR und Rluc-MR .....	29
4.2 BRET .....	30
5. Zusammenfassung .....	34
6. Literaturverzeichnis .....	35
7. Abbildungsverzeichnis .....	38
Danksagung .....	
Lebenslauf .....	

# 1. Einleitung

## 1.1 Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor

Das Mineralokortikoid Aldosteron spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Kochsalz-, Kalium- sowie Wasserhomöostase und dadurch auch des Blutdrucks. Es ist Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Hypovolämie, Hyponatriämie und niedrige Blutdruckwerte führen über die Ausschüttung von Renin und die nachfolgende Prozessierung von Angiotensinogen zu Angiotensin I und schließlich Angiotensin II zu einer Stimulation der Aldosteronfreisetzung in der Nebenniere. Aldosteron bewirkt in Kolon und Niere die transepitheliale Resorption von Natrium und dadurch auch eine Regulation des Wasserhaushaltes sowie eine kompensatorische Sekretion von Kalium (1).

Der Mineralokortikoidrezeptor (MR) ist der klassische Rezeptor für Aldosteron. Seine Bedeutung zeigt sich in der Betrachtung von transgenen Mäusen, denen der MR fehlt. Diese MR<sup>-/-</sup>-Mäuse sind nicht zu einem Überleben über den durchschnittlich zehnten Tag hinaus fähig (2). Sie zeigen eine Hyponatriämie bei erhöhter fraktioneller Ausscheidung von Natrium über die Niere, eine Hyperkaliämie und Dehydratation. Ebenso sind eine Reihe monogenetisch bedingter Formen der Hyper- und Hypotonie bekannt, die Funktionsstörungen im RAAS aufweisen. Beispielhaft sind Mutationen des MR, die im Falle der *Hypertension Exacerbated in Pregnancy* zur Aktivierung auch durch andere Hormone außer Aldosteron und dadurch zur Hypertonie führen oder wie beim Pseudohypoaldosteronismus Typ I durch einen partiellen Funktionsverlust die Natriumreabsorption behindern (3). Aldosteron und der MR sind somit essentiell für die Salz- und Wasserhomöostase.

Eine pathophysiologische Bedeutung von Aldosteron über die Regulation der Salz- und Wasserhomöostase hinaus wurde in klinischen Studien zur Wirkung von Aldosteronantagonisten sichtbar. Die Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) zeigte eine erhebliche Reduktion der Gesamtmortalität um 30% bei Patienten mit schwerer chronischer Herzinsuffizienz, die neben der Standardtherapie bestehend aus ACE-Hemmer, Diuretikum und zum Teil Digoxin und  $\beta$ -Blocker zusätzlich mit dem Aldosteronantagonisten Spironolacton behandelt wurden (4). Durch die niedrige Dosierung von Spironolacton war keine hämodynamische Wirkung im Sinne einer

Blutdrucksenkung zu beobachten. Der beobachtete Effekt der Antagonisierung von Aldosteron in Bezug auf Mortalität wie auch Hospitalisierungsrate aufgrund von Herzinsuffizienz war allerdings so deutlich, dass die Studie nach einer durchschnittlichen Laufzeit von zwei Jahren vorzeitig abgebrochen wurde.

In einer weiteren Studie wurde der Effekt des selektiven Mineralokortikoidrezeptorantagonisten Eplerenon bei Patienten nach einem Myokardinfarkt untersucht, die eine schwere Herzinsuffizienz aufwiesen. In dieser sogenannten Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) wurde der Aldosteronantagonist wiederum zusätzlich zu einer Standardtherapie gegeben, wobei hier eine signifikante Reduktion der Gesamt-Mortalität und der Hospitalisierung aufgrund von Herzinsuffizienz um jeweils 15% festgestellt wurde (5). Der in beiden Studien sichtbare günstige Effekt der Aldosteronantagonisten legt eine Bedeutung des Aldosterons in der Pathophysiologie der untersuchten Herz-Kreislauf-Erkrankungen nahe, die nicht auf die reine Regulation der Salz- und Wasserhomöostase zurückzuführen ist.

Aldosteron übt seine klassischen Effekte über die Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor aus. Der MR gehört zu der Familie der Steroidhormonrezeptoren und ist genetisch mit den Glukokortikoid-, Androgen-, Progesteron- und Östrogenrezeptoren verwandt. Wie die übrigen Mitglieder der Steroidhormonrezeptor-Familie agiert der MR als Transkriptionsfaktor. In Abwesenheit von stimulierendem Hormon liegt der MR vor allem gebunden an das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) im Zytosol vor, ist aber in unterschiedlichem Ausmaß auch nukleär nachweisbar bis hin zu einer überwiegend (80% der Zellen) gleichmäßigen Verteilung auf Zytosol und Nukleus (6-8). Die Bindung von Hormon führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, einer Dissoziation von Hsp90 und einer Translokation in den Zellkern. Als Homodimer bindet der MR im Zellkern an die Promotorregion von sogenannten Aldosteron-induzierten Proteinen (AIP) und reguliert deren Transkription, wobei der Ort der Dimerbildung noch zu klären ist (9). Auch die Bildung von Heterodimeren mit dem Glukokortikoidrezeptor ist beschrieben. Es wurde gezeigt, dass diese sich im Zytosol bilden können, ihre mögliche physiologische Bedeutung ist aber noch unklar (9;10).

Neben den genomischen Wirkungen von Aldosteron sind nun nicht-klassische Wirkmechanismen in den Fokus gerückt. Es wurden bereits nach Minuten Effekte von Aldosteron nachgewiesen, die auch unter der Blockade von Transkription und Proteinsynthese bestanden, sodass als Erklärung eine transkriptionelle Wirkung nicht in Frage kommt (11). Daher werden diese Wirkungen als nicht-genotrop bezeichnet. Im Falle anderer Steroidhormone wie Östrogen und Progesteron wurden schnelle Effekte auf die Existenz weiterer Rezeptoren neben den klassischen Östrogen- und Progesteronrezeptoren zurückgeführt (12;13). Schnelle Aldosteronwirkungen konnten sowohl MR-abhängig als auch MR-unabhängig nachgewiesen werden (14). Ein möglicher nicht-klassischer membranständiger Rezeptor für Aldosteron wurde nicht nachgewiesen.

*In vitro* sind schnelle Aldosteronwirkungen für verschiedenste Gewebe beschrieben, darunter Leukozyten, Nieren- und Kolonepithelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten (11). Die physiologische oder pathophysiologische Bedeutung dieser Effekte ist noch unklar. Es wurden aber mögliche an schnellen Aldosteronwirkungen beteiligte Signalwege gefunden. Zu diesen zählen die Wirkungsvermittlung über Proteinkinase C (PKC), Inositol Trisphosphat (IP<sub>3</sub>), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinase (JNK), cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), ERK1/2 und die intrazelluläre Calciumkonzentration (15).

Beispielhaft seien hier die Interaktionen mit dem ERK1/2-Signalweg angeführt. Diese beinhalten eine schnelle ERK1/2-Aktivierung bei Stimulation durch Aldosteron und in Anwesenheit des MR, die zu einer (Trans)Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) führt (14). Dieser kann die Entstehung kardialer und renaler Fibrose fördern, welche die Leistung dieser Organe verschlechtert (16). Als ein Verbindungsglied zwischen MR und EGFR wird die Tyrosinkinase cSrc angesehen (16). Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Aktivierung des MR durch Aldosteron zu einer erhöhten Expression des EGFR führt (17;18). Da die Inhibition von ERK1/2 *in vitro* zu einer Abnahme der Transaktivierungsaktivität des MR führt, kann angenommen werden, dass auch eine Interaktion der genomischen Wirkungen (also etwa der EGFR-Expression) und nicht-genotropen Effekte des Aldosteron besteht (14;16). Die Zwischenstationen und Interaktionen eines solchen Zusammenspiels und der nicht-genotropen Effekte an sich sind noch näher zu charakterisieren, vor allem im Hinblick

auf eine mögliche pathophysiologische Bedeutung der MR-EGFR-Signalwege in der Fibroseentstehung.

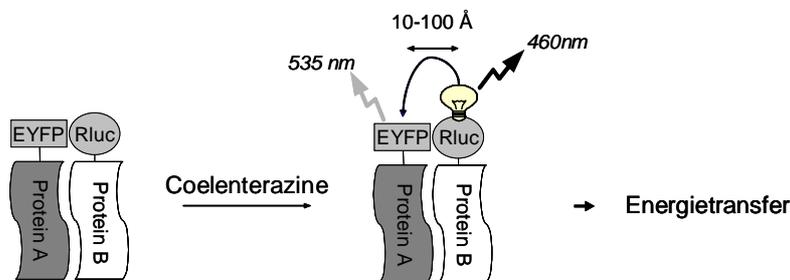
## **1.2 Biolumineszenz Resonanz Energietransfer**

Biolumineszenz Resonanz Energietransfer (BRET) ist eine Methode zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Das Konzept ist eine Weiterentwicklung des auf der Grundlage des Förster Resonanz Energietransfer entwickelten Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET).

Die Methode FRET nutzt üblicherweise den Energietransfer zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen oder Molekülen, die an die auf Interaktionen hin zu untersuchenden Proteine gekoppelt werden. Hierbei werden die beiden unterschiedlichen Fluorophore so gewählt, dass die Emission des Donor-Fluorophors ihr Maximum in etwa bei derjenigen Wellenlänge erreicht, die eine Anregung des Akzeptor-Fluorophors bewirken kann. Nach externer Anregung des Donors mit monochromatischem Licht findet ein Energietransfer zum Akzeptor statt, der in der Regel in einer messbaren Erhöhung der Emission des Akzeptors resultiert (19;20). Ein solcher Energietransfer ist allerdings nur bei sehr kleiner Distanz, in der Regel 10 bis 100 Å, zwischen den beiden Fluorophoren möglich, da die Effizienz des Energietransfers mit der sechsten Potenz der Distanz zwischen Donor und Akzeptor abnimmt (20;21). Dies soll die Unterscheidung funktioneller Proteininteraktionen von zufälligen Annäherungen aufgrund der Molekularbewegung ermöglichen.

FRET hat gegenüber anderen Methoden zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen wie Ko-Immunpräzipitationen oder Yeast-Two-Hybrid einige Vorteile, beispielsweise können Interaktionen in lebenden Zellen und im Zeitverlauf untersucht und dargestellt werden. Bei der Detektion durch konfokale Mikroskopie werden Interaktionen in einzelnen Zellen und subzellulären Kompartimenten messbar. Es existieren jedoch auch Nachteile dieser Methodik. Im Gegensatz zur Ko-Immunpräzipitation ist es zum Beispiel in der Regel nicht möglich, mit endogenen Proteinen zu arbeiten, da die in Fusionsproteinen enthaltenen Fluorophore essentiell sind. Ein weiteres Problem liegt in der externen Anregung des Donors; hierbei kann es zur Bleichung des Donors, direkten Anregung des Akzeptors bei überlappenden Anregungsspektren und zur Autofluoreszenz von endogenen Zellbestandteilen kommen (22).

In Anbetracht dessen wurde der Biolumineszenz Resonanz Energietransfer als verwandte Technik entwickelt und erstmalig 1999 an bakteriellen Proteinen durchgeführt (23). BRET verwendet als Donor für den Energietransfer statt fluoreszierender Moleküle eine Luciferase aus *Renilla reniformis* (Rluc). Durch Oxidation ihres Substrates Coelenterazine, dessen native Form oder Varianten verwendet werden können, erreicht Rluc eine Emission von Licht mit einem Maximum bei  $\sim 475\text{nm}$  (bei Verwendung von Coelenterazine h) (24). Wie im Fall von FRET gilt, dass ein Energietransfer und damit eine Anregung des fluoreszierenden Akzeptorproteins stattfindet, sofern die Distanz geringer als 10 bis  $100 \text{ \AA}$  ist. Die resultierende Emission bei höherer Wellenlänge durch den Akzeptor wird detektiert und zur Berechnung des BRET Signals verwendet.



**Abbildung 1** BRET, schematische Darstellung

Es sind verschiedene Kombinationen von Akzeptorproteinen mit Rluc möglich. Zusätzlich kann auch durch die Wahl des Substrates für die Luciferase der methodische Aufbau je nach Fragestellung variiert werden. Ein Beispiel wäre die Verwendung von Rluc als Donor und Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP) als Akzeptorprotein (s. Abb.1). Als Substrat können hier Coelenterazine h oder EnduRen<sup>TM</sup> verwendet werden. Coelenterazine h eignet sich aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit und hohen Lumineszenz für Kurzzeitmessungen. Ein solcher Versuchsaufbau mit Rluc als Donor und YFP, einem YFP-Derivat oder einem Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) als Akzeptor sowie Coelenterazine h als Substrat wird auch als BRET<sup>1</sup> bezeichnet, da es sich um das ursprüngliche Konzept handelt. Unter Verwendung des gleichen Donor-Akzeptor-Paares besteht die Möglichkeit, mit EnduRen<sup>TM</sup> als Substrat Langzeitmessungen, auch bezeichnet als extended BRET (eBRET), durchzuführen. Nach Aufnahme von EnduRen<sup>TM</sup> in die Zelle wird durch zelleigene Esterasen über mehrere Stunden kontinuierlich Coelenterazine h freigesetzt (25;26). Ein drittes

Konzept, BRET<sup>2</sup>, benötigt als Akzeptor die GFP-Varianten GFP<sup>2</sup> oder GFP10 und DeepBlueC<sup>TM</sup> als Substrat für Rluc. Die maximale Emission der Luciferase verschiebt sich unter Verwendung von DeepBlueC<sup>TM</sup> zu einer kürzeren Wellenlänge (~395nm), sodass der Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Emissionsmaximum zunimmt (24). Allerdings hat dieses Substrat mit einer sehr kurzen Halbwertszeit den Nachteil der Instabilität. Eine Übersicht über die gebräuchlichen BRET-Systeme gibt Tabelle 1.

	<b>BRET<sup>1</sup></b>	<b>eBRET</b>	<b>BRET<sup>2</sup></b>
Donor	Renilla Luciferase	Renilla Luciferase	Renilla Luciferase
Akzeptor	YFP oder EGFP		GFP <sup>2</sup> oder GFP10
Substrat	Coelenterazine h	EnduRen <sup>TM</sup>	DeepBlueC <sup>TM</sup>
Filtereinstellungen (nm), Beispiele	Donor: 440-500 (YFP), 400-475 (EGFP) Akzeptor: 510-590 (YFP), 500-550 (EGFP)		Donor: 370-450 Akzeptor: 500-530
Abstand der Emissionsmaxima (nm)	~55		~115
Messdauer (Größenordnung)	Minuten	Stunden	Sekunden
Messung in Zellextrakten	möglich	nicht möglich	möglich

**Tabelle 1 (27)** Übersicht über BRET<sup>1</sup>, BRET<sup>2</sup> und eBRET

BRET ist bereits für eine Vielzahl von Molekülen zur Interaktionsuntersuchung verwendet worden. Darunter sind auch Vertreter der Steroidhormonrezeptor-Familie wie der Östrogen- und der Glukokortikoidrezeptor (28;29).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Interaktionen des MR mit anderen Proteinen sind im Hinblick auf physiologische und pathophysiologische Wirkungen des Aldosteron von großem Interesse. Es ist möglich, dass auch pathophysiologische Wirkungen über nicht-klassische Wirkmechanismen des MR vermittelt werden. Dazu können auch direkte Protein-Protein-Interaktionen zählen, beispielsweise mit der Tyrosinkinase cSrc und anderen Zwischenstationen des EGFR-/ERK1/2-Signalwegs. Um diese Interaktionen in lebenden Zellen und im Zeitverlauf untersuchen zu können, wurde ein BRET-System für den MR entwickelt. Als Donor-Akzeptor-Paar wurde eine Kombination der Renilla Luciferase mit EYFP verwendet. Die Konzeption des Systems erfolgte als eBRET mit Messdauern von einigen Stunden, um die Interaktionen des MR und die Effekte verschiedener Reagenzien verfolgen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Klonierung der Plasmide

#### 2.1.1 pRluc-MR

Um in der Zellkultur den Mineralokortikoidrezeptor gekoppelt an Renilla Luciferase exprimieren zu können, wurde ein Plasmid konstruiert, in dem die Gene der beiden Proteine fusioniert wurden. Als Vektor wurde das Plasmid pRluc-C1 (BRET<sup>2</sup><sub>TM</sub> Bioluminescence Resonance Energy Transfer Renilla Luciferase Fusion Protein Expression Vector, pRluc-C1, PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim) verwendet, in dessen Multiple Cloning Site sich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bgl*III sowie *Hind*III befinden. Durch einen Doppelverdau mit diesen beiden Enzymen (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) bei 37°C über Nacht wurden 2 µg pRluc-C1-DNA linearisiert und in einem 0,5%-Agarose-Gel in TBE durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Ausschneiden der die linearisierte DNA enthaltenden Bande wurde die DNA aus dem Gel extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN GmbH, Hilden).

Das Gen des humanen MR wurde aus pEGFP-hMR mittels einer analog durchgeführten Restriktion mit *Bgl*III und *Hind*III, Gelelektrophorese und Gelextraktion isoliert.

Die Ligation des MR-Gens in pRluc-C1 mittels T4 DNA Ligase wurde im Verhältnis 3:1 von MR-Gen zu Vektor angesetzt und bei 14°C über Nacht inkubiert. Anschließend transformierten wir chemisch kompetente *E.coli* One Shot Top10F' mit dem Ligationsansatz durch Hitzeschock. Dafür wurden die Bakterien zunächst für 30 min auf Eis aufgetaut und nach Zugabe des Ligationsansatzes für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte daraufhin für 30 s bei 42°C, daran schloss sich eine einstündige Inkubation in SOC-Medium bei 225 rpm und 37°C im Schüttelinkubator an. Daraufhin wurden die transformierten Bakterien auf LB-Agar-Platten mit 25 mg/l Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C und Raumluft inkubiert. Sechs der gewachsenen Kolonien wurden in jeweils 5 ml LB-Medium mit 25 mg/l Kanamycin als Suspensionskultur über Nacht bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Aus den Suspensionskulturen wurde die Plasmid-DNA unter Verwendung von Plasmid-Miniprep-Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) isoliert. Durch einen Restriktionsverdau mit

*Bgl*III und *Hind*III und anschließende Gelelektrophorese wurde die Ligation von Insert und Vektor überprüft.

### **2.1.2 Sequenzierung:**

Zur Überprüfung der korrekten Klonierung von pRluc-MR sequenzierten wir den Übergang des Luciferase-Gens zum Gen des MR. Als Primer verwendeten wir die folgende Nukleotidsequenz:

5'-GAG CTC CCA GAG TCA GAC AT-3'

Der Primer bindet an die DNA des MR-Gens 492 bis 512 bp vom Startcodon aus in 3'-Richtung, sodass von dort aus der Beginn des MR-Gens, der Übergang zur Multiple Cloning Site von pRluc-C1 sowie das 3'-Ende des Renilla Luciferase-Gens sequenziert werden konnten.

Zur Sequenzierung fällten wir 4 µg pRluc-MR-DNA, indem zunächst ein Zehntel des Volumens Natriumacetat und in einem zweiten Schritt das Zweifache des Volumens eiskalter 100% Ethanol zugegeben und gemischt wurde. Das Gemisch wurde für >30 min bei -20°C inkubiert und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, woraufhin der Überstand verworfen und 1 ml 70% Ethanol zugegeben wurde. Nach erneutem Zentrifugieren konnte der Überstand erneut verworfen und die DNA an der Luft getrocknet werden. Die trockene DNA wurde zur Durchführung der Sequenzierung an die Biotech AG in Martinsried geschickt. Anschließend wurde mit Hilfe der Clustal W-Software ein Sequenzvergleich mit der publizierten Sequenz des humanen MR vorgenommen.

### **2.1.3 pEYFP-MR**

Für den BRET-Ansatz wird ein fluoreszierendes Akzeptorprotein benötigt, das durch die in der Luciferase-Reaktion emittierten Photonen angeregt werden kann. In der Kombination der Renilla Luciferase mit EnduRen als Substrat eignet sich als Akzeptorprotein das Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP). Die Klonierung erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben.

Zunächst wurde das Plasmid pEYFP-p85β durch eine Restriktion mit den Enzymen *Bgl*III und *Sac*II (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) linearisiert und

damit das p85 $\beta$ -Gen aus dem Plasmid entfernt. Die anschließende Auftrennung und Gelextraktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Das hMR-Gen wurde wiederum aus pEGFP-hMR durch Verdau mit *Bgl*III und *Sac*II sowie elektrophoretische Auftrennung und Gelextraktion isoliert. Die Ligation von 50 ng linearisiertem pEYFP-C1 und 100 ng hMR-DNA mit Hilfe von T4 DNA Ligase erfolgte bei 14°C über Nacht. Die Transformation von *E.coli*-Bakterien und nachfolgende Kultivierung in LB-Kanamycin-Medium wurde wie unter 2.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Klonierung wurde durch eine Restriktion mit *Bgl*III und *Sac*II und anschließende Gelelektrophorese überprüft.

## **2.2 Zellkultur**

Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden mit HEK-293 Zellen durchgeführt, die in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert und zweimal wöchentlich subkultiviert wurden. Die stabil transfizierten HEK Zell-Klone wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit alle vier bis fünf Tage in 10 cm-Zellkulturschalen subkultiviert. Als Kulturmedium diente DMEM/Ham's F-12 Medium (Biochrom AG, Berlin) mit Zusätzen inklusive 10% fetalem Kälberserum (FCS); die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Transfektionen erfolgten in serumfreiem DMEM/Ham's F-12 Medium unter Verwendung von PolyFect-Reagenz (PolyFect Transfection Reagent, QIAGEN GmbH, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

## **2.3 Überprüfung der Funktionalität der Fusionsproteine**

### **2.3.1 SEAP-Reporter-Assay**

Zur Untersuchung der Transaktivierungs-Aktivität der MR-Konstrukte führten wir ein Reporter-Assay mit der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) als Reporterprotein durch. Das Gen für die sekretorische alkalische Phosphatase steht in dem Plasmid pGRE-SEAP unter der Kontrolle eines Promotors, der drei Glucocorticoid-response Elemente (GRE) enthält. Nach Stimulation mit Aldosteron transaktiviert der MR das GRE-Element, woraufhin SEAP exprimiert wird. Wir

verwendeten dieses Konstrukt zur Untersuchung der Funktionalität der MR-Fusionsproteine (Rluc-MR und EYFP-MR).

Die Zellen wurden mit jeweils 0,05 µg pGRE-SEAP-DNA und Plasmid-DNA der MR-Konstrukte (pRluc-MR bzw. pEYFP-MR) pro Well in 24-Well-Zellkulturplatten transfiziert. Als Transfektionskontrolle diente die zusätzliche Transfektion mit 0,05 µg pEGFP pro Well mit der Messung des EGFP-Gehalts der Zellen. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Inkubation der Zellen mit sterilfiltrierten Inkubationslösungen, die 1:1000 DMSO als Vehikel bzw. 10 nM Aldosteron jeweils in serumfreiem Medium enthielten. Nach weiteren 24 h wurde die Aktivität der SEAP im Medium bestimmt. Dazu wurden aus jedem Loch 60 µl Medium entnommen und mit 60 µl SEAP-Puffer zur Inaktivierung anderer Phosphatasen bei 65°C für 30 min inkubiert. Die fluorometrische Bestimmung der SEAP-Aktivität erfolgte mit 100 µl dieses Ansatzes nach Zugabe von 100 µl AttoPhos-Substrat in einer Konzentration von 0,6 mg/ml in AttoPhos-Puffer (Attophos AP Fluorescent Substrate System, Promega GmbH, Mannheim). Die Messung des AttoPhos-Umsatzes erfolgte im Multiwell-Multilabel-Counter Victor<sup>2</sup> (Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer GmbH, Rodgau-Jügesheim) in schwarzen 96-Well-Platten. Es wurde über einen 450 nm Filter angeregt und die Emission über einen 590 nm Filter für 1 s pro Loch bestimmt. Die Messung wurde mit 60 Wiederholungen und einer Pause von jeweils 30 s zwischen den Wiederholungen durchgeführt. Der Substratumsatz pro min diente als Maß für die SEAP-Aktivität.

Nach Entnahme des Mediums wurden die Zellen in 150 µl MOPS-Triton pro Well für 30 min lysiert, anschließend in Reaktionsgefäße überführt und bei 13000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. In 100 µl des Überstands wurde die EGFP-Fluoreszenz auf einer 96-Well-Platte im Victor<sup>2</sup> gemessen. Die Anregung erfolgte über einen 485 nm Filter und die Messung der Emission über einen 535 nm Filter bei einer Messdauer von 1 s pro Loch. Die Messwerte aus nicht transfizierten Ansätzen wurden sowohl bei der Substratumsatz-Bestimmung als auch bei der EGFP-Messung von den übrigen Ansätzen subtrahiert.

### 2.3.2 MR-Transaktivierungsaktivität in Abhängigkeit von der DNA-Menge

Zur Bestimmung der MR-Transaktivierungsaktivität in Abhängigkeit von der Menge der Plasmid-DNA im Transfektionsansatz führten wir ein SEAP-Assay mit 0,05 µg pGRE-SEAP-DNA und 0,05 µg pEGFP-DNA sowie pEYFP-MR-DNA in unterschiedlichen Mengen zwischen 1 ng und 10 ng im Transfektionsansatz pro Well durch. Das SEAP-Assay wurde wie unter 2.3.1 beschrieben ausgeführt.

### 2.3.3 SEAP-Interaktions-Assay

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Rluc-MR und EYFP-MR führten wir ein SEAP-Interaktions-Assay durch. Dafür transfizierten wir HEK-293 Zellen mit jeweils 0,05 µg pGRE-SEAP-DNA und pEGFP-DNA pro Loch und bestimmten die SEAP-Aktivität pro EGFP-Fluoreszenz wie unter 2.3.1 beschrieben. Zusätzlich enthielten die Transfektionsansätze unterschiedliche Mengen pEYFP-MR-DNA allein oder in Kombination mit variierenden Mengen pRluc-MR-DNA. In Tabelle 2 sind die verschiedenen Transfektionsansätze festgehalten. Die Stimulation erfolgte mit 10 nM Aldosteron, während als Vehikel DMSO in einer Verdünnung von 1:1000 diente.

0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  1 ng pEYFP-MR-DNA	0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  3 ng pEYFP-MR-DNA	0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  6 ng pEYFP-MR-DNA
0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  1 ng pEYFP-MR-DNA 2 ng pRluc-MR-DNA	0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  1 ng pEYFP-MR-DNA 5 ng pRluc-MR-DNA	0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  3 ng pEYFP-MR-DNA 3 ng pRluc-MR-DNA

**Tabelle 2** SEAP-Interaktions-Assay für EYFP-MR und Rluc-MR

Es sollte untersucht werden, wie sich die SEAP-Aktivitätssteigerung bei Transfektion mit sowohl pRluc-MR als auch pEYFP-MR im Vergleich zur Transfektion mit pEYFP-MR allein verhielt. Ein funktionstüchtiger MR im Fusionsprotein Rluc-MR sollte in Kombination mit EYFP-MR nach Transfektion mit gleichen Mengen der Plasmide zu einer ähnlich hohen SEAP-Aktivitätssteigerung führen wie nach Transfektion mit der doppelten Menge von pEYFP-MR allein. Eine Aktivitätssteigerung entsprechend derer nach Transfektion mit der einfachen Menge von pEYFP-MR spräche in diesem System

für eine Inaktivität des Rluc-MR, eine noch geringere Aktivitätssteigerung für eine hemmende Interaktion.

Analog führten wir ein SEAP-Interaktions-Assay mit Rluc-MR und His-GR durch. Da die Bildung von Heterodimeren aus Mineralocorticoid- und Glucocorticoidrezeptoren beschrieben ist, sollten auch die Interaktionscharakteristika von Rluc-MR und einem GR-Fusionsprotein untersucht werden. Dazu verwendeten wir einen His-gekoppelten GR, den wir entsprechend EYFP-MR einsetzten (s. Tab 3). Die Ansätze wurden mit 100 nM Dexamethason stimuliert oder mit DMSO als Vehikel 1:1000 verdünnt als Kontrollansätze verwendet.

0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  1 ng pHis-GR-DNA		0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  6 ng pHis-GR-DNA	
0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  1 ng pHis-GR-DNA 2 ng pRluc-MR-DNA	0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  1 ng pHis-GR-DNA 5 ng pRluc-MR-DNA	0,05 µg pGRE-SEAP-DNA 0,05 µg pEGFP-DNA  3 ng pHis-GR-DNA 3 ng pRluc-MR-DNA	

**Tabelle 3** SEAP-Interaktions-Assay für His-GR und Rluc-MR

His-GR allein wurde nur in einer Menge von 1 und 6 ng pHis-GR-DNA verwendet. Gegenüber dem EYFP-MR/Rluc-MR-Interaktions-Assay wurde zusätzlich der Kombinationsansatz aus 1 ng pHis-GR- und 5 ng pRluc-MR-DNA in Abwesenheit von Hormon untersucht, um Aufschluss über die Ruheaktivität zu erlangen.

### **2.3.4 Bestimmung der subzellulären Lokalisation des EYFP-MR durch Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurden HEK Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Mikroskopierdeckgläschen von 2 cm Durchmesser angesät und nach 24 h mit 0,9 µg pEYFP-MR allein bzw. in Kotransfektion mit pRluc-MR in einer Menge von je 0,8 µg transfiziert. Die Stimulation mit 10 nM Aldosteron, 4 µM Geldanamycin oder einer Kombination aus beiden erfolgte in serumfreiem Medium 48 h nach Ansaat, wobei als Vehikel DMSO in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet wurde. Geldanamycin führt zur Dissoziation des MR von den Hitzeschockproteinen. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Zellen in einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axiovert S100) unter

Anregung bei 490 nm und FITC Bandpass in 40facher Vergrößerung mikroskopiert und mit Hilfe eines Hamamatsu Imaging Systems fotografiert.

#### 2.4 Nachweis des EYFP-MR mittels Western Blot

Zum Nachweis von EYFP-MR transfizierten wir HEK Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale bei 80% Konfluenz mit 6 µg pEYFP-MR und ersetzten den Transfektionsmix nach 24 h durch serumfreies Medium. Nach 48 h nahmen wir die Zellen in 400 µl RedMix auf und homogenisierten die Probe mit Hilfe einer Kanüle. Wir verwendeten den Mercaptoethanol-haltigen RedMix zur Reduktion der Disulfidbrücken der Proteine. Die Probe wurde nochmals 1:1 in RedMix verdünnt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Eine 10 cm-Zellkulturschale mit konfluent wachsenden untransfizierten HEK Zellen wurde als Negativkontrolle ebenso behandelt. Daraufhin trennten wir die Proteine auf einem 7%-SDS-Polyacrylamidgel, das sich wie in Tabelle 4 beschrieben zusammensetzte, durch Gelelektrophorese auf.

Sammelgel 3% [ml]		Trenngel 7% [ml]	Trenngel 12% [ml]
0.288	Acrylamide/Bis 26:0.7	-	-
-	Acrylamide/Bis 29.3:0.53	1.500	2.550
0.030	APS 10%	0.075	0.075
0.025	SDS 10%	0.125	0.125
0.625	0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	-
-	1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.563	1.563
1.540	H <sub>2</sub> O	2.930	1.880
0.01	TEMED	0.02	0.02

**Tabelle 4** SDS-Polyacrylamidgel

Die Elektrophorese wurde in Running Buffer bei zunächst 11 mA für 36 min und nachfolgend bei 21 mA für 1 h 35 min durchgeführt. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte in Transferpuffer mit Hilfe eines Semi-Dry Blotting Systems bei 2 mA/cm<sup>2</sup> für 35 min. Anschließend wurde die Membran für 5 min in TBS gewaschen und für 1 h in Blocking Solution inkubiert. Es folgten drei weitere 5-minütige Waschschrte in TBS-Tween 0.1% und die Inkubation mit dem Erstantikörper Anti-GFP (Living Colors GFP Monoclonal Antibody, Clontech-Takara Bio-Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) bei 4°C über Nacht. Vor Inkubation mit dem Peroxidase (HRP)-gekoppelten Zweitantikörper (HRP-Goat anti-rabbit-IgG, Rockland, Gilbertsville, USA) in Blocking Solution für 2 h bei Raumtemperatur wurde die

Membran erneut dreimal je 5 min in TBS-Tween 0.1% gewaschen. Nach der Inkubation folgten drei 5-minütige Waschschrte in TBS und eine letzte Waschung in Seralwasser. Daraufhin wurde die Detektion der Zweitantikörper durch Enhanced Chemiluminescence (ECL) mittels Pierce ECL Western Blotting Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## **2.5 Stabile Transfektion von HEK Zellen mit pRluc-MR bzw. pRluc**

Zur stabilen Transfektion wurden HEK-293 Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen mit 1 µg pRluc-MR-DNA oder pRluc-DNA transfiziert. Eine weitere Zellkulturschale wurde nicht transfiziert und als Absterbekontrolle verwendet. Nach 24 h wurde das Medium durch DMEM/HAM-F12 Medium mit 10% fetalem Kälberserum und 600 mg/l G418 ersetzt. Mit dem Eukaryontenantibiotikum G418 wurden diejenigen Zellen selektioniert, die das im Plasmid pRluc-C1 enthaltene Resistenzgen gegen G418 exprimierten. Das mit G418 versetzte Medium wurde zweimal in der Woche erneuert, bis die Absterbekontrolle frei von Zellen war. Daraufhin wurden die transfizierten Zellen abgelöst, gezählt und in einer Konzentration von 3 Zellen pro Loch auf einer 96-Well-Zellkulturplatte angesät. Das Wachstum der Zellen wurde beobachtet und die nur einen Klon enthaltenden Ansätze ausgewählt. Die Transfektion wurde durch Bestimmung der Lumineszenz bei 460 nm nach Zugabe von Coelenterazine h als Substrat der Luciferase überprüft, sobald die Zellen zu 30-50% konfluent wuchsen. Die positiven Klone wurden in 3 cm-Zellkulturschalen überführt, bei Konfluenz in 10 cm-Zellkulturschalen überführt und wie unter 2.2 beschrieben subkultiviert.

## **2.6 Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET)**

### **2.6.1 Messung des BRET**

Die Messung des BRET-Signals erfolgte im Multiwell-Multilabel-Counter Victor<sup>2</sup> (PerkinElmer GmbH, Rodgau-Jügesheim) bei 37°C. Es wurden pro Loch für jeweils 10 s die Fluoreszenz bei 535 nm und anschließend die Lumineszenz bei 460 nm gemessen und die CPS (counts per second)-Werte zur Berechnung der BRET-ratio in Abhängigkeit von der Zeit (t) verwendet.

$$\text{BRET-ratio} = \text{CPS}_{535\text{nm}}(t) / \text{CPS}_{460\text{nm}}(t) - C_f$$

mit Korrekturfaktor  $C_f = \text{CPS}_{535\text{nm}}(t) / \text{CPS}_{460\text{nm}}(t)$  in Ansätzen ohne fluoreszierenden Akzeptor

Im Anschluss an die BRET-Messung wurden die Zellen in 50  $\mu\text{l}$  MOPS-Triton-Puffer pro Loch für 30 min lysiert, das Lysat bei 13000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert und im Überstand der Proteingehalt mittels BCA-Reaktion gegen Rinderalbumin als Standard wie unter 2.7 beschrieben gemessen.

### **2.6.2 BRET in transient transfizierten Zellen**

HEK-293 Zellen wurden mit pRluc bzw. pRluc-MR und zusätzlich entweder mit pcDNA3.1His-C-hMR oder pEYFP-MR transfiziert. Die Ansätze, in denen der nicht fluoreszierende His-MR exprimiert wurde, dienten der Berechnung des Korrekturfaktors  $C_f$ . Nach 24 h wurde der Transfektionsmix durch serumfreies Medium ersetzt, nach weiteren 24 h erfolgte die Inkubation in 50  $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium mit 240  $\mu\text{M}$  EnduRen für 1,5 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ . Anschließend wurde Versuchslösung zugegeben, die Aldosteron, Geldanamycin oder beide Substanzen enthielt, und die BRET-Messung durchgeführt. Die Konzentration während der Messung in 100  $\mu\text{l}$  lag für EnduRen bei 120  $\mu\text{M}$ , Aldosteron war 10 nM konzentriert.

### **2.6.3 BRET in stabil transfizierten Zellen**

Stabil mit pRluc bzw. pRluc-MR transfizierte HEK-293 Zellen wurden sechs bis sieben Stunden nach Ansaat in einer 96-Well-Zellkulturplatte transfiziert. Um die für die Berechnung des Korrekturfaktors  $C_f$  notwendigen Daten zu erhalten, wurden Wells mit pcDNA3.1His-C-hMR transfiziert. Die Transfektion der übrigen Wells erfolgte zur Beobachtung eines BRET mit pEYFP-MR. Zur Ermittlung der für die BRET-Messung am besten geeigneten Transfektionsbedingungen führten wir ein BRET-Experiment, in dem wir stabil Rluc-MR exprimierende Zellen mit unterschiedlichen Mengen pEYFP-MR kotransfizierten. Wir wählten Ansätze mit 0,1 $\mu\text{g}$ , 0,2 $\mu\text{g}$  oder 0,3 $\mu\text{g}$  pEYFP-MR pro Well. In allen weiteren BRET-Experimente transfizierten wir mit 0,3 $\mu\text{g}$  pEYFP-MR pro Well.

24 h nach Ansaat wurde das serumfreie Medium erneuert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 67  $\mu$ M EnduRen in 90  $\mu$ l serumfreiem Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 1.5 h inkubiert. Daraufhin wurde die BRET-Messung bei 37°C im Victor<sup>2</sup> über drei Messreihen durchgeführt. Nach Zugabe der Versuchslösungen von jeweils 10  $\mu$ l wurde die BRET-Messung für mindestens zwei Stunden fortgeführt. Untersucht wurden die Effekte von Aldosteron, Geldanamycin, der simultanen Zugabe beider Stoffe und des Antagonisten Spironolacton. Die Substanzen waren in 100  $\mu$ l Medium während der Messung folgendermaßen konzentriert: Aldosteron 10 nM, Geldanamycin 4  $\mu$ M, Spironolacton 100 nM; DMSO als Vehikel wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

### **2.7 Proteinbestimmung mittels Bicinchinonic Acid (BCA)-Reaktion:**

Die Proteinmenge wurde mit Hilfe der BCA-Reaktion bestimmt. Dazu wurden BC-Reagenz A und 4% Kupfersulfat im Verhältnis 50:1 gemischt und aus diesem Ansatz je 300  $\mu$ l zu 7,5  $\mu$ l MOPS-Triton-Zellysat bzw. 15  $\mu$ l Rinderalbumin (BSA)-Proteinstandard-Lösungen auf einer 96-Well-Platte gegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Absorption photometrisch im Victor<sup>2</sup> über einen 560 nm Filter für 1 s pro Loch gemessen. Die Eichkurve zur Errechnung der Proteinkonzentration in der Probe ergab sich aus den Absorptionswerten der Proteinstandard-Ansätze in den Konzentrationen 100, 300, 500 und 700 mg/l.

### **2.8 Statistik**

Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten student's t-Test bestimmt, wobei  $p \leq 0,05$  vorgegeben und Signifikanz mit \* gekennzeichnet wurde. Bei Experimenten mit mehreren Versuchsgruppen wurde die Signifikanz mittels ANOVA untersucht.

### **2.9 Materialien**

*Antikörper-Verdünnungslösung:* 1x TBS; 0,1% Tween-20; 5% BSA

*Blocking Solution:* 1x TBS; 0,1% Tween-20; 5% Milchpulver

*DMEM/HAM F-12 Medium mit Zusätzen (pro Liter DMEM/HAM F-12 Medium):* 13 mmol NaHCO<sub>3</sub>; 15 mmol HEPES; 5 mg humanes Apo-Transferrin; 5 mg bovines Insulin; 36 µg Hydrocortison; 10 µg Maus-EGF; 5 µg Na-Selenit; 10% FCS

*Laufpuffer:* 26 mM Tris-Base; 3,5 mM SDS; 192 mM Glycin

*LB-Medium (pro Liter):* 10 g Tryptone; 5 g Hefe-Extrakt; 171 mM NaCl (mit 1 N NaOH auf pH 7.0 titriert)

*LB-Agar-Platten (pro Liter):* 10 g Tryptone; 5 g Hefe-Extrakt; 171 mM NaCl (mit 1 N NaOH auf pH 7.0 titriert); 15 g Agar

*MOPS-Triton:* 20 mM MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure); 0,1% Triton X-100

*10x PBS:* 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

*2xRedMix:* 125 mM Tris-HCl pH 6.8; 4% SDS; 10% 2-Mercaptoethanol; 20% Glycerol; 0.01% Bromphenolblau

*RIPA:* PBS; 1% Nonidet P-40; 0,1% SDS; 0,1% Triton X-100; Proteaseinhibitor-Cocktail 1:1000; 1 mM Na-Orthovanadate

*SEAP-Puffer:* 60 mM L-Homoarginin; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>; 100 mM Tris-HCl (pH 9,3)

*SOC-Medium (pro Liter):* 5 g Hefe-Extrakt; 20 g Tryptone; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM Glucose

*10xTBE:* 0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 20 mM EDTA

*10x TBS:* 0,2 M Tris-Base; 1,37 M NaCl (auf pH 7,6 titriert mit HCl)

*Transferpuffer:* 25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 20% Methanol

Die verwendeten Materialien wurden über die folgenden Firmen bezogen:

Axxora Deutschland GmbH, Lörrach; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg; Biochrom AG, Berlin; Biometra, Göttingen; Clontech-Takara Bio-Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich; Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Merck Chemicals Ltd., Darmstadt; Millipore Corporation, Billerica, USA; MWG Biotech AG, Martinsried; New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main; PAA Laboratories, Linz, Österreich; PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim; Pierce Biotechnology, Rockford, USA; Promega GmbH, Mannheim; Rockland, Gilbertsville, USA; QIAGEN GmbH, Hilden; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Spectrum Laboratories, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Funktionelle Charakterisierung des EYFP-MR

Nach der Klonierung eines EYFP-MR Fusionsgens wurde zunächst die Expression des Fusionsproteins im Western Blot überprüft. Im Western Blot zeigt sich eine nicht in der Kontrollbahn erscheinende Bande an einer Stelle, die einer Größe von knapp 130 kDa entspricht.

Weiterhin wurde überprüft, ob eine Funktionalität des MR auch im Fusionsprotein gegeben war. Dies erfolgte durch Untersuchung der subzellulären Lokalisation zunächst mittels Fluoreszenzmikroskopie. Wie in Abbildung 3 sichtbar war der EYFP-MR in

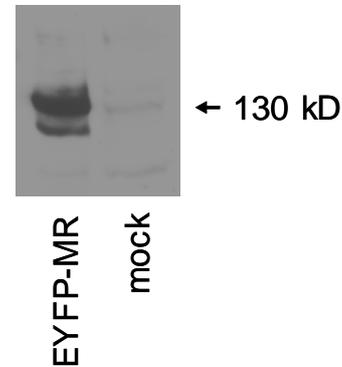


Abb. 2 Western Blot für EYFP-MR

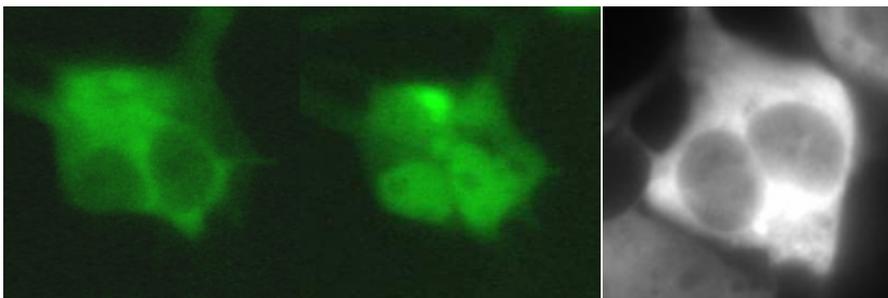


Abb. 3 Fluoreszenzmikroskopie nach Transfektion mit pEYFP-MR unter Kontrollbedingungen (links) und nach Stimulation durch Aldosteron (Mitte) und durch Aldosteron und Geldanamycin (rechts)

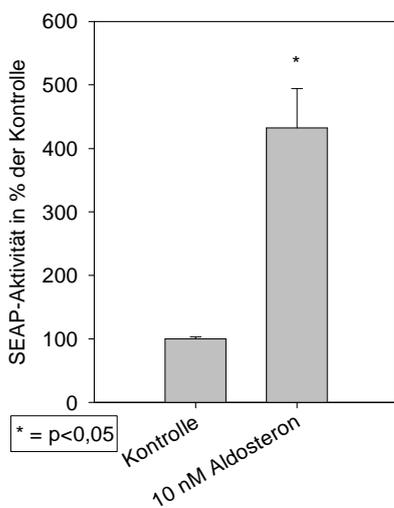


Abb. 4 SEAP-Assay für EYFP-MR

Abwesenheit von Aldosteron überwiegend im Zytosol lokalisiert, während er nach Stimulation durch Aldosteron vorherrschend im Nucleus nachweisbar war. Die Migration in den Nucleus war bei 37° nach 10 Minuten bereits vollständig. Ebenfalls im Zytosol sahen wir den MR nach gleichzeitiger Inkubation mit Aldosteron und Geldanamycin, das zur Dissoziation des MR vom Hitzeschockprotein Hsp90 führt und die Aldosteronbindung erschwert.

Da der MR als Transkriptionsfaktor agiert,

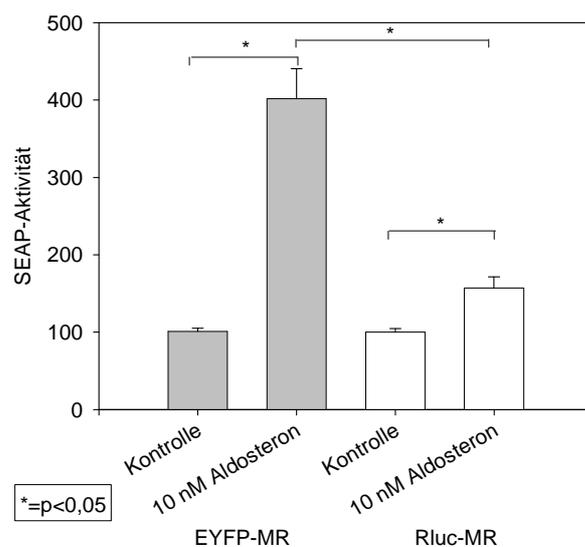
kontrollierten wir die Funktionalität des EYFP-MR durch ein Reporter-Assay, bei dem die sekretorische alkalische Phosphatase als Reporterprotein bei gegebener Transkriptionsfaktoraktivität des MR-Fusionsproteins synthetisiert wurde. Die SEAP-Aktivität als Maß der MR-Aktivität bei Transfektion mit pEYFP-MR betrug bei Stimulation mit 10 nM Aldosteron das 4,33-fache derjenigen aus nichtstimulierten Kontrollansätzen (siehe Abbildung 4). Diese Aktivitätszunahme ist vergleichbar der Aktivitätssteigerung durch andere MR-Fusionsproteine wie zum Beispiel EGFP-MR und spricht für die Funktionalität des EYFP-MR (14;30).

### 3.2 Funktionelle Charakterisierung des Rluc-MR

Ebenso wie der EYFP-MR wurde auch Rluc-MR nach der Klonierung charakterisiert. Zunächst wurde eine Sequenzierung des Fusionsgens angefertigt. Die Auswertung der Sequenz mit Hilfe der Clustal W Software zeigte, dass die Multiple Cloning Site in ihrer Primärsequenz unverändert war und sich der Übergang zum MR-Gen im richtigen Leseraster befand. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die ersten 469 sicher sequenzierten Basenpaare mit der publizierten Sequenz des MR übereinstimmen. Daraus wurde auf eine gelungene Klonierung geschlossen.

Ein Nachweis des Fusionsproteins gelang mit dem einzigen auf dem Markt befindlichen Antikörper (Anti-Renilla Luciferase, clone 5B11.2, Chemicon International Inc., Millipore Corporation, Billerica, USA) nicht.

Zur funktionellen Charakterisierung wendeten wir wie im Falle von EYFP-MR das SEAP-Reporterassay an (siehe Abbildung 5). In den Kontrollansätzen ohne Aldosteron zeigte sich kein Unterschied im Vergleich der absoluten SEAP-Aktivitätswerte der EYFP-MR und Rluc-MR, also eine vergleichbare Ruheaktivität. Dahingegen waren die

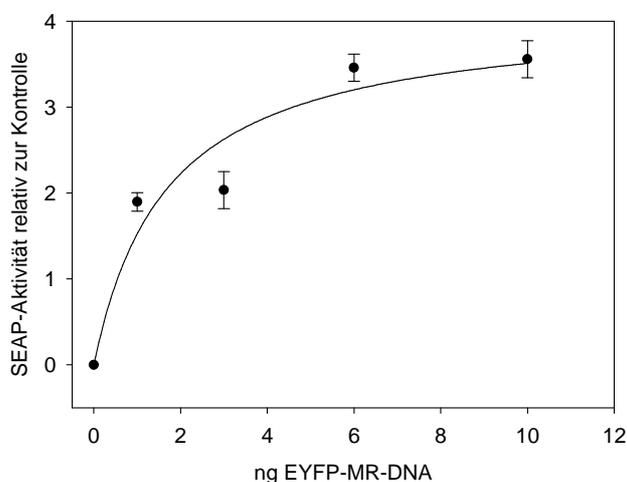


**Abb.5** SEAP-Assay für Rluc-MR

Aktivitäten in den Aldosteron-stimulierten Ansätzen in Anwesenheit von Rluc-MR signifikant niedriger als bei EYFP-MR. Hier ergab sich eine Stimulierbarkeit der SEAP-Aktivität durch den EYFP-MR auf 402% gegenüber 157% durch Rluc-MR. Dieser Anstieg der SEAP-Aktivität ist zwar statistisch signifikant gegenüber der Aktivität in Abwesenheit von Aldosteron, aber dennoch zu gering, um einer normalen Funktion des MR im Fusionsprotein Rluc-MR zu entsprechen. Im Falle einer gänzlich aufgehobenen Funktion sollte die SEAP-Aktivität keine messbare Steigerung bei Stimulation mit Aldosteron erfahren. Da dieses aber der Fall ist, muss von einer eingeschränkten Funktion ausgegangen werden.

### 3.3 Interaktion von Rluc-MR mit EYFP-MR und His-GR

Zur Klärung der Frage nach einer Interaktionsfähigkeit von EYFP-MR und Rluc-MR konzeptionierten wir ein SEAP-Interaktionsassay, in dem die Auswirkung einer Kotransfektion mit unterschiedlichen Mengen beider Fusionsgene dadurch sichtbar wurde, dass Rluc-MR dominant-negativ wirkte.



**Abb.6** SEAP-Assay, SEAP-Aktivität in Abhängigkeit von der Transfektionsmenge pEYFP-MR

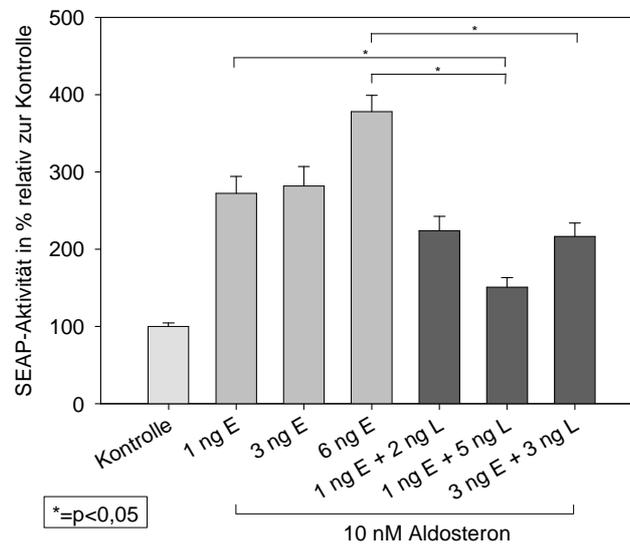
Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen Transfektionsmenge von pEYFP-MR-DNA und SEAP-Aktivitätssteigerung bei Aldosteron-Stimulation untersucht. Die Bestimmung des Sättigungsbereiches des Systems ist notwendig, um Änderungen der SEAP-Aktivitätsantwort bei Kotransfektion mit unterschiedlichen Mengen Rluc-MR-DNA zu detektieren. Es ergab sich eine halbmaximale SEAP-

Aktivitätssteigerung bereits bei Transfektion mit 1,7 ng EYFP-MR-DNA und eine maximale Aktivitätssteigerung um den Faktor 4,1 (siehe Abbildung 6).

Aufgrund dessen wurden die Ansätze im Interaktionsassay folgendermaßen gewählt (s. auch unter 2.3.3): Ansätzen mit 1 bzw. 3 bzw. 6 ng pEYFP-MR-DNA wurden solche mit der Kombination aus 1 ng pEYFP-MR-DNA und 2 bzw. 5 ng pRluc-MR-DNA

sowie aus jeweils 3 ng pEYFP-MR- und pRluc-MR-DNA gegenübergestellt. Wie in Abbildung 6 ersichtlich, werden im Bereich zwischen 1 und 6 ng pEYFP-MR-DNA Änderungen der SEAP-Aktivitätssteigerung durch Änderung der transfizierten DNA-Menge sichtbar. Die Transfektion mit 6 ng EYFP-MR-DNA führt zu einer signifikanten SEAP-Aktivitätssteigerung von 378% gegenüber 272% bei Transfektion mit 1 ng und 282% im Ansatz mit 3 ng EYFP-MR-DNA. Die Aktivitätszunahme zwischen den beiden letztgenannten Ansätzen ist nicht signifikant. Die Betrachtung der mit beiden Fusionsproteinen kotransfizierten Ansätze sollte Erkenntnisse über ein Zusammenwirken der beiden MR-Konstrukte bringen. Im Falle einer fehlenden Interaktion wird eine SEAP-Aktivität erwartet, die derjenigen der Transfektion mit der entsprechenden EYFP-MR-DNA-Menge allein entspricht, also zum Beispiel dem 1 ng-pEYFP-MR-Ansatz im Fall der Kombination von 1 ng EYFP-MR- und 2 ng Rluc-MR-DNA. Eine Interaktion im Sinne einer gesteigerten Transkription ließe hier höhere SEAP-Aktivitätswerte erwarten, ähnlich einer Transfektion mit der gesamten Menge an EYFP-MR-DNA, im Beispiel 3 ng. Auch eine Interaktion mit verminderter Transkriptionsaktivität ist denkbar.

Die Kombination aus 1 ng EYFP-MR- und 2 ng Rluc-MR-DNA führt zu auf 224% erniedrigten SEAP-Aktivitätswerten, die jedoch weder im Vergleich mit den 1 ng- noch den 3 ng-EYFP-MR-Ansätzen signifikante Unterschiede zeigen. Fügt man zu 1 ng EYFP-MR- größere Mengen (hier 5 ng) Rluc-MR-DNA hinzu, so zeigt sich eine signifikante Abnahme der



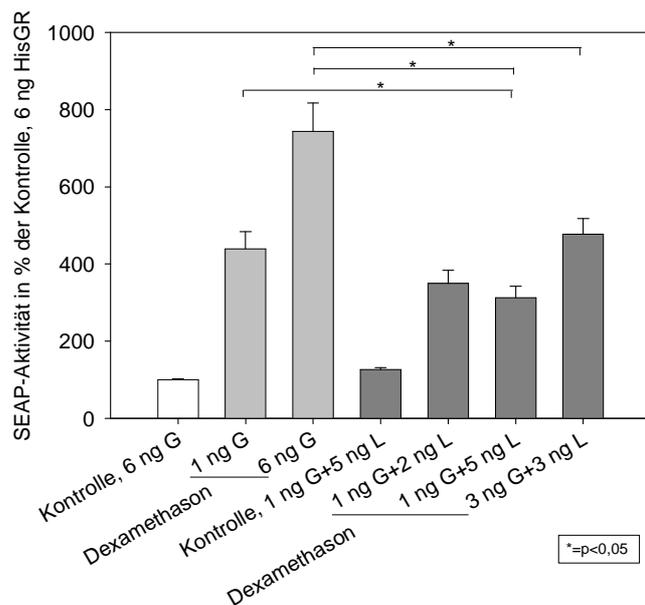
**Abb.7** SEAP-Interaktions-Assay für pEYFP-MR (E) und pRluc-MR (L)

SEAP-Aktivitätssteigerung. In diesem Ansatz ist die Transkriptionswirkung des MR durch Zugabe von Aldosteron mit einer Steigerung der SEAP-Aktivität auf 151% des unstimulierten Kontrollwerts gering, wenn auch nachweisbar. Auch die Kombination

von jeweils 3 ng der beiden MR-Fusionsgene zeigt eine signifikant gehemmte SEAP-Aktivitätssteigerung (217%) im Vergleich zum Ansatz mit 6 ng pEYFP-MR-DNA, nicht jedoch verglichen mit dem 3 ng EYFP-MR-DNA enthaltenden Ansatz.

Das SEAP-Interaktionsassay spricht für eine Interaktion von EYFP-MR und Rluc-MR. Hierbei ergibt sich jedoch kein Zusammenwirken im Sinne einer gesteigerten Transkription, sondern Rluc-MR scheint EYFP-MR in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor zu hemmen bzw. die Transkription zu verlangsamen. Dies zeigt sich in der geringeren SEAP-Aktivität im Vergleich mit Ansätzen, die eine entsprechende Menge pEYFP-MR allein enthalten. Es findet zwar immer noch eine signifikante SEAP-Aktivitäts-Steigerung im Vergleich zum unstimulierten Ansatz statt, deren Ausmaß ähnelt jedoch dem einer Transfektion mit Rluc-MR allein.

Die Interaktion von Rluc-MR mit einem GR-Fusionsprotein (His-GR) wurde ebenfalls in einem SEAP-Interaktionsassay untersucht, das dem EYFP-MR/Rluc-MR-Interaktions-Assay entsprechend konzipiert war. In Abwesenheit von Hormon waren



die SEAP-Aktivitätswerte der Ansätze mit 6 ng pHis-GR- bzw. 1 ng pHis-GR- und 5 ng Rluc-MR-DNA nicht signifikant unterschiedlich. Daher wurden die SEAP-Aktivitätswerte der übrigen Ansätze auf den Kontrollansatz mit 6 ng pHis-GR-DNA normiert, sodass sie wie im Fall des EYFP-MR/Rluc-MR-Interaktions-Assays zur Darstellung kommen (siehe Abbildung 8). Die SEAP-

**Abb.8** SEAP-Interaktions-Assay für pHis-GR (G) und pRluc-MR (L)

Aktivität nach Stimulation mit 100 nM Dexamethason steigerte sich bei der Transfektion mit 6 ng statt 1 ng pHis-GR-DNA von 439% auf 744%. Wiederum ergaben sich bei Kotransfektion mit Rluc-MR niedrigere SEAP-Aktivitätswerte. Die Kombination aus 1 ng pHis-GR- und 2 ng pRluc-MR-DNA zeigte mit 349% eine geringere SEAP-Aktivitätssteigerung nach Dexamethason-Stimulation gegenüber dem

mit 1 ng pHis-GR-DNA transfizierten Ansatz. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Bei Kotransfektion von 1 ng pHis-GR- und 5 ng pRluc-MR-DNA ergab sich allerdings eine SEAP-Aktivität von 313%, die signifikant geringer war als die SEAP-Aktivität in beiden (1 und 6 ng) Ansätzen aus pHis-GR allein. Auch die Kotransfektion mit gleichen Mengen pRluc-MR und pHis-GR (jeweils 3 ng) zeigte mit einer Steigerung der SEAP-Aktivität auf 478% des Kontrollansatzes signifikant niedrigere Werte als im Falle der Transfektion mit 6 ng pHis-GR-DNA.

Die Interaktion von Rluc-MR und His-GR scheint derjenigen mit EYFP-MR zu ähneln. Auch hier führt eine Kotransfektion mit steigenden Mengen pRluc-MR zu einer Abnahme der SEAP-Aktivitätssteigerung nach Hormonstimulation. Rluc-MR scheint also auch mit His-GR im Sinne einer verlangsamten bzw. gehemmten Transfektionsaktivität zu interagieren.

### **3.4 BRET**

#### **3.4.1 BRET in transient transfizierten Zellen**

Die Interaktion von EYFP-MR und Rluc-MR sollte in der Folge in einem BRET-Assay untersucht werden. Zunächst wurde das BRET-Signal nach transienter Transfektion von HEK-293 Zellen mit pEYFP-MR und pRluc-MR geprüft. Hierbei zeigte sich zwar die Funktionalität der Renilla Luciferase im Fusionsprotein, allerdings erreichte die Lumineszenz nur relativ geringe Werte. Die Lumineszenz betrug in diesen Ansätzen das 1,2- und 1,4-fache der Lumineszenz von Ansätzen mit nicht-leuchtendem MR (HisMR) und das 1,5- bis 2,1-fache der Lumineszenz von untransfizierten Zellen. In Ansätzen mit Rluc-C1, also der ungekoppelten Luciferase, ergaben sich geringfügig bessere Lumineszenz-Werte. Sie erreichte das 2,0- bis 2,4-fache der Lumineszenz in Ansätzen mit HisMR sowie das 2,5- bis 3,6-fache derer von untransfizierten Zellen. Zur Berechnung eines BRET ließen sich diese Experimente nicht verwenden.

#### **3.4.2 BRET in stabil transfizierten Zellen**

Aus diesem Grund wurde eine stabil mit pRluc-MR transfizierte HEK-293 Zelllinie erzeugt. Diese Klone erreichten in korrespondierenden Ansätzen eine vier- bis sechs-

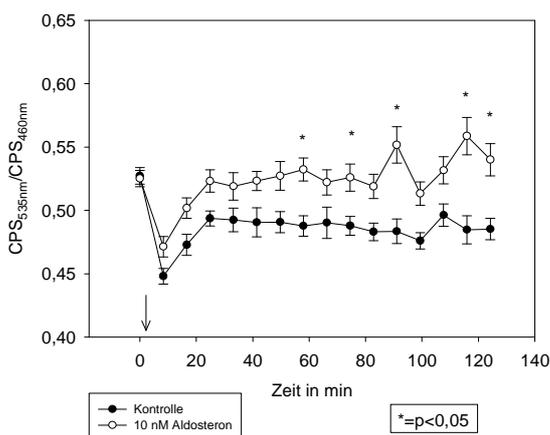
fach höhere Lumineszenz als transient transfizierte Zellen. Für die Messung von BRET wurden die stabil Rluc-MR exprimierenden Klone mit pEYFP-MR oder pcDNA3.1His-C-hMR transfiziert. Die Ansätze mit pEYFP-MR und Rluc-MR dienten der Untersuchung der Interaktion der beiden MR-Fusionsproteine. Die Koexpression von His-hMR und Rluc-MR ergab Daten zur Berechnung des Korrekturfaktors  $C_f$ , da hier ein nicht-fluoreszierender Interaktionspartner für Rluc-MR vorhanden war. Das BRET-Signal wurde nach der bereits unter 2.6.1 beschriebenen Formel berechnet:

$$\text{BRET-ratio} = \text{CPS}_{535\text{nm}}(t)/\text{CPS}_{460\text{nm}}(t) - C_f$$

Eine Veränderung des BRET-Signals nach Zugabe von Aldosteron sollte eine Interaktion von EYFP-MR und Rluc-MR nachweisen. Es zeigte sich tatsächlich eine deutliche Zunahme des BRET-Signals bei Stimulation durch Aldosteron. Allerdings ergab sich eine Änderung des Verhältnisses  $\text{CPS}_{535\text{nm}}/\text{CPS}_{460\text{nm}}$  auch in den His-hMR exprimierenden Ansätzen, die für die Berechnung des Korrekturfaktors verwendet wurden. Daher wurde der Korrekturfaktor  $C_f$  in Abhängigkeit von der Zeit und den hinzugefügten Substanzen näher untersucht.

Das Signal in Kontrollansätzen ohne Zugabe von Aldosteron war konstant und nicht von Null verschieden.

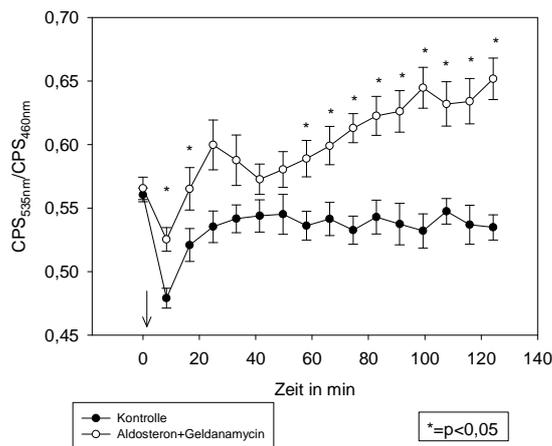
### 3.4.3 Untersuchung des Korrekturfaktors $C_f$



**Abb.9** Korrekturfaktor  $C_f$  +/- Aldosteron

Es ergab sich während der ersten 90 Minuten nur zu einem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung des  $C_f$ . Im weiteren Verlauf schwankten die Werte allerdings stark, weswegen wir uns auf die

Der Korrekturfaktor  $C_f$  ist als das Verhältnis  $\text{CPS}_{535\text{nm}}/\text{CPS}_{460\text{nm}}$  in Abwesenheit des fluoreszierenden Akzeptors definiert, hier also in Ansätzen, die neben Rluc-MR statt des EYFP-MR einen nicht-fluoreszierenden His-hMR exprimieren. Zunächst untersuchten wir, ob auf die Zugabe von Aldosteron eine Änderung des Korrekturfaktors folgte (Abbildung 9).



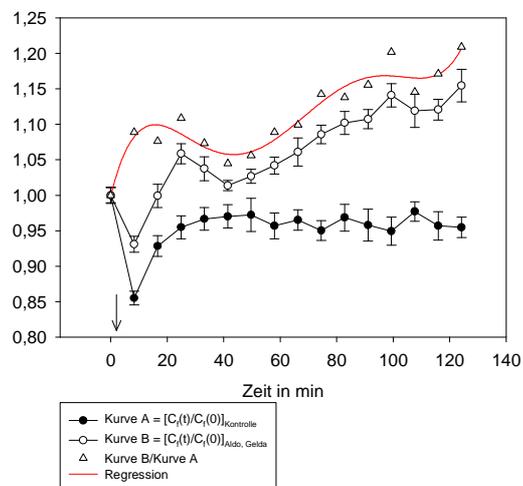
**Abb.10** Korrekturfaktor  $C_f$  +/- Aldosteron und Geldanamycin

Werte bis zu 90 Minuten konzentrierten und auf eine Korrektur des  $C_f$  verzichteten. Auch bei Spironolacton und Geldanamycin erfolgte keine Änderung des  $C_f$ .

Die Zugabe von Aldosteron und Geldanamycin allerdings bewirkte einen Anstieg des Korrekturfaktors (siehe Abbildung 10). Das Niveau des  $C_f$  war in verschiedenen Experimenten nicht konstant, sodass es nicht möglich war, einen Mittelwert zu bilden und für weitere Experimente zu verwenden. Die Entwicklung des  $C_f$  von seinem unstimulierten Anfangswert aus war allerdings gut vorauszusagen, wie in Abbildung 11 verdeutlicht wird. Die Abbildung zeigt das Verhältnis der Messpunkte zum Datenpunkt vor der Stimulation, also  $C_f(t)/C_f(0)$ . Es wurde für jedes Messloch einzeln dieses Verhältnis errechnet und anschließend der Mittelwert bestimmt. Aus der Rechnung folgt, dass jede Kurve mit dem Wert 1,0 vor Beginn der Stimulation startet. Im Zeitverlauf verhält sich die Kontrollkurve nach einem anfänglichen Abfall annähernd konstant. Die anfängliche Minderung des Signals nach Zugabe von Vehikel oder anderen Substanzen war unabhängig von der zugefügten Substanz zu beobachten. Im Falle der mit Aldosteron und Geldanamycin stimulierten Zellen erhöht sich das Verhältnis  $C_f(t)/C_f(0)$  in Abhängigkeit von der Zeit. Des Weiteren bildeten wir das Verhältnis  $[C_f(t)/C_f(0)]_{\text{Aldosteron+Geldanamycin}}/[C_f(t)/C_f(0)]_{\text{Kontrolle}}$ .

Werte bis zu 90 Minuten konzentrierten und auf eine Korrektur des  $C_f$  verzichteten. Auch bei Spironolacton und Geldanamycin erfolgte keine Änderung des  $C_f$ .

Die Zugabe von Aldosteron und Geldanamycin allerdings bewirkte einen Anstieg des Korrekturfaktors (siehe Abbildung 10). Das Niveau des  $C_f$  war in verschiedenen Experimenten nicht konstant, sodass es nicht möglich war,



**Abb.11** Korrekturfaktor in Abhängigkeit von der Zeit und der zugefügten Substanz (+/- Aldosteron und Geldanamycin)

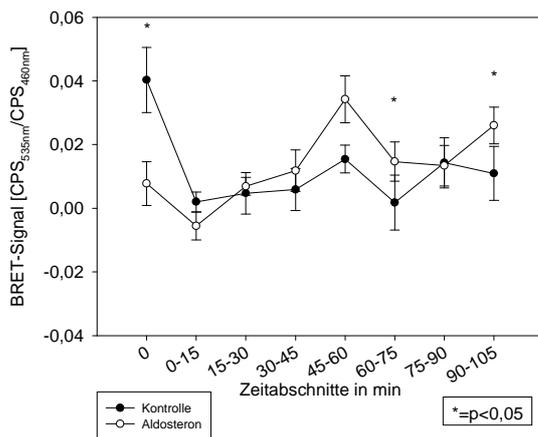
Kombination von Aldosteron und Geldanamycin aus Kontroll- $C_f$ -Werten nach folgender Formel:

$$C_{f, \text{Aldosteron+Geldanamycin}}/C_{f, \text{Kontrolle}} = b_5 * t^5 + b_4 * t^4 + b_3 * t^3 + b_2 * t^2 + b_1 * t^1 + b_0$$

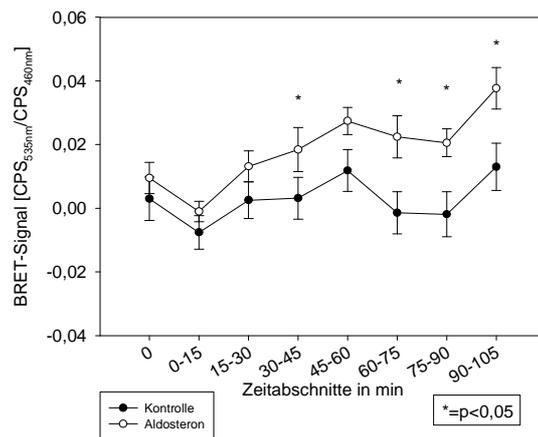
mit  $b_0=0,9999$ ,  $b_1=0,0158$ ,  $b_2=-8,3774 * 10^{-4}$ ,  $b_3=1,7054 * 10^{-5}$ ,  $b_4=-1,4436 * 10^{-7}$ ,  $b_5=4,3456 * 10^{-10}$ .

### 3.4.4 Bestimmung der DNA-Menge für die Transfektion

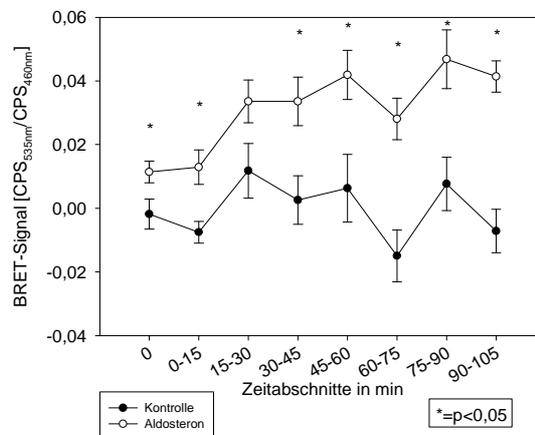
Wir führten ein BRET-Experiment zur Bestimmung der am besten geeigneten DNA-Menge für die Transfektion mit pEYFP-MR durch. Die Ansätze enthielten 0,1 $\mu$ g, 0,2 $\mu$ g oder 0,3 $\mu$ g pEYFP-MR pro Well. Wie aus den Abbildungen 12-14 hervorgeht, ergibt sich bei Transfektion mit 0,1 $\mu$ g pEYFP-MR kein von den Kontrollansätzen



**Abb.12** BRET-Signal nach Transfektion mit 0,1  $\mu$ g pEYFP-MR pro Well, +/- Aldosteron



**Abb.13** BRET-Signal nach Transfektion mit 0,2  $\mu$ g pEYFP-MR pro Well, +/- Aldosteron



**Abb.14** BRET-Signal nach Transfektion mit 0,3  $\mu$ g pEYFP-MR pro Well, +/- Aldosteron

unterschiedliches BRET-Signal nach Stimulation mit Aldosteron. Die Transfektion mit 0,2 $\mu$ g pEYFP-MR führt nach Hormonzugabe zu einem zu einigen Zeitpunkten signifikant erhöhten BRET-Signal. Dieses Signal ist nach Transfektion mit 0,3 $\mu$ g pEYFP-MR jedoch am deutlichsten und statistisch signifikant. Wir entschieden uns daher, in den nachfolgenden Experimenten mit 0,3 $\mu$ g pEYFP-MR pro Well zu transfizieren.

### 3.4.5 Effekt von Aldosteron, Geldanamycin und Spironolacton

Die Zusammenfassung aller Experimente, in denen BRET nach Stimulation mit Aldosteron gemessen wurde, zeigt Abbildung 15. Während BRET in den Kontrollansätzen um Null schwankte, stieg das BRET-Signal nach Zugabe von 10 nM Aldosteron. Die Differenz zum Kontrollsignal betrug bis zu 0,056. Auffällig war, dass bei Zellen höherer Passagen keine Änderung des BRET-Signals durch Aldosteron entstand. Wir verwendeten daher zur Berechnung von BRET nur Experimente mit Zellen der Passagen bis einschließlich Passage 15.

Die zur Kontrolle ebenfalls durchgeführten Experimente, in denen Rluc ohne den angehängten MR in Kombination mit EYFP-MR exprimiert wurde, ergaben keine Änderung des BRET-Signals in Anwesenheit von Aldosteron (siehe Abbildung 16).

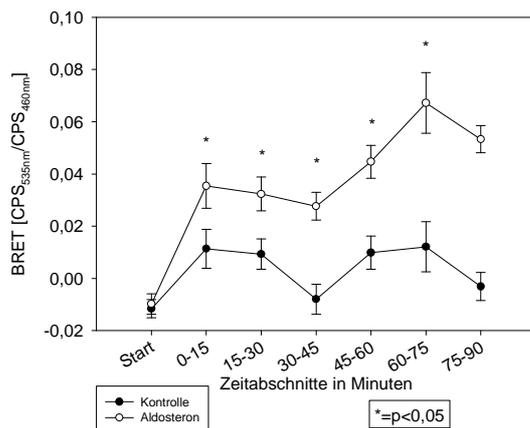


Abb.15 BRET-Signal +/- Aldosteron

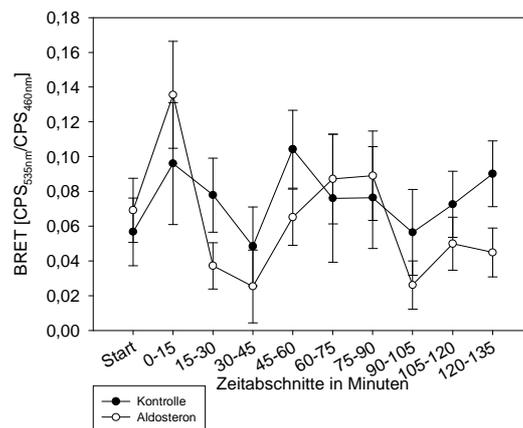
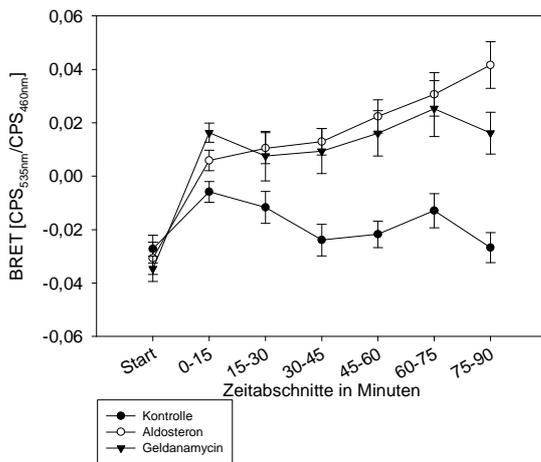
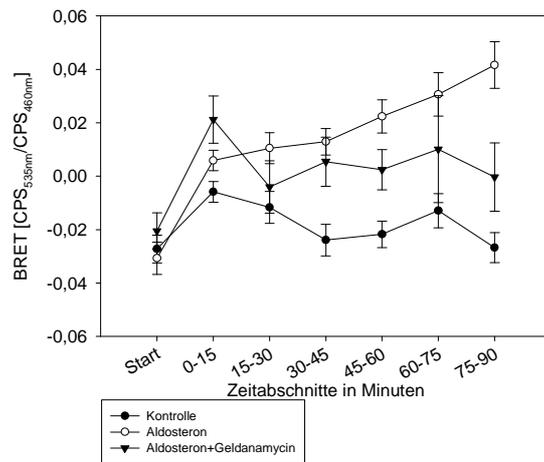


Abb.16 BRET-Signal bei Transfektion mit pRluc-C1, +/- Aldosteron



**Abb.17** BRET-Signal (Kontrolle, Aldosteron, Geldanamycin)

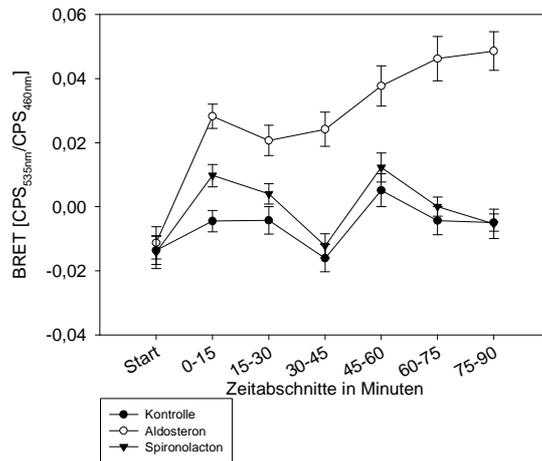


**Abb.18** BRET-Signal (Kontrolle, Aldosteron, Aldosteron und Geldanamycin)

Weiterhin untersuchten wir den Effekt von Geldanamycin und der kombinierten Gabe von Geldanamycin und Aldosteron. Der Effekt von Geldanamycin war ähnlich dem von Aldosteron (Abbildung 17). Demgegenüber zeigten die Experimente mit der Kombination aus Geldanamycin und Aldosteron ein von den Ansätzen mit Aldosteron allein verschiedenes BRET-Signal (Abbildung 18). Dieses war nicht signifikant gegenüber den Kontrollansätzen.

Im gleichen Versuchsaufbau wurde auch die Wirkung des Aldosteronantagonisten Spironolacton untersucht. Spironolacton zeigte keinen Effekt auf das BRET-Signal (Abbildung 19).

Ein erhöhtes BRET-Signal war also nach Zugabe von Aldosteron, Geldanamycin und deren Kombination messbar, nicht jedoch nach Stimulation mit Spironolacton oder in Abwesenheit von Rluc-MR.



**Abb.19** BRET-Signal +/- Spironolacton

## **4. Diskussion**

### **4.1 Die Fusionsproteine EYFP-MR und Rluc-MR**

Für ein aussagekräftiges BRET-Experiment ist die Funktionalität der untersuchten Fusionsproteine essentiell. Zur Klärung der Funktionalität von EYFP-MR und Rluc-MR verwendeten wir verschiedene Verfahren.

EYFP-MR untersuchten wir mit Hilfe von Western Blots, Fluoreszenzmikroskopie und SEAP-Assay. Eine Bande in der plausiblen Höhe von knapp 130 kDa im Western Blot, die Translokation von EYFP-MR vom Zytosol in den Nucleus in der Fluoreszenzmikroskopie sowie die Aktivitätszunahme im SEAP-Assay sprechen für geglückte Klonierung, Expression und Funktionalität von EYFP-MR.

Auch Rluc-MR wurde auf seine Funktionalität hin untersucht. Eine Teilsequenzierung zeigte die korrekte Einfügung des MR-Gens an der Schnittstelle zu Rluc. Es gelangen jedoch weder ein Western Blot noch - bei zu geringer Lichtstärke - die mikroskopische Untersuchung von Rluc-MR. Das SEAP-Assay zeigte zunächst keine eindeutigen Ergebnisse. Hier resultierte eine sehr geringe SEAP-Aktivitätssteigerung durch Aldosteron nach Transfektion mit pRluc-MR. Zwar war dieses Ergebnis signifikant höher als die Kontrollwerte, mit einer uneingeschränkten Funktion des Rluc-MR ist diese im Vergleich zu EYFP-MR deutlich geringere Aktivitätssteigerung aber nicht vereinbar. Es stellt sich nun die Frage, auf welcher Ebene die Funktion von Rluc-MR eingeschränkt ist. Auf struktureller Ebene könnte durch die Fusion von Rluc und MR die korrekte Faltung des MR erschwert sein oder der Rluc-Anteil des Fusionsproteins den Zugang von Hormon oder anderen Proteinen mechanisch behindern. Denkbar ist eine Beeinträchtigung der Hormonbindung, ferner der Dimerisierung, des Transports in den Nucleus oder der Interaktion mit der DNA und Cofaktoren. Für die Frage, ob ein BRET-Assay mit dem MR durchgeführt werden kann, ist prinzipiell eine Dimerisierung der beiden Fusionsproteine vorauszusetzen. Darüber sollte ein SEAP-Interaktionsassay Aufschluss geben. Die Hemmung der Transaktivierungsaktivität von EYFP-MR bzw. His-GR durch Rluc-MR lassen auf eine Interaktion schließen, womit die Voraussetzung für ein BRET-Assay erfüllt wäre. Die Funktionseinschränkung von Rluc-MR liegt demnach auf einer der Dimerisierung nachgeordneten Ebene. Wir sahen von einer genaueren Charakterisierung der Lokalisation der Beeinträchtigung ab. Möglicherweise

würde eine Neuklonierung von Rluc-MR, beispielsweise nach Einfügen einer längeren Sequenz zwischen Rluc und MR, in vollständiger Funktionalität des MR resultieren.

## 4.2 BRET

In transient transfizierten Zellen reichte die Lumineszenz von Rluc-MR nicht aus, um Signale zuverlässig vom Hintergrund abzugrenzen. Da die Lumineszenz im Fall von Rluc-C1 höhere Werte erreichte, führt möglicherweise die Kopplung an ein anderes Protein bzw. speziell an den MR zu einer geringeren Expression oder Lumineszenz-Entwicklung. Die Lumineszenz war allerdings auch bei Kotransfektion mit pHisMR oder pEYFP-MR herabgesetzt. Außerdem war sie erhöht nach stabiler Transfektion mit pRluc-MR. Beides spricht für eine nach transienter Transfektion nicht ausreichende Expression als Ursache. Eine BRET-Messung war bei transienter Transfektion also nicht möglich. Dies beeinträchtigt die Verwendung des Verfahrens, da eine stabile Transfektion mit den jeweiligen Fusionsproteinen deutlich arbeitsaufwändiger und komplizierter als die wiederholte transiente Transfektion ist. Es fällt auf, dass die in der Literatur für andere Proteine beschriebenen BRET-Assays transiente Transfektionen verwenden, auch im Fall von verwandten Steroidhormonrezeptoren wie dem Estrogen- oder Glucocorticoidrezeptor (28;29). Möglicherweise werden diese Rezeptoren auch als Fusionsproteine mit der Luciferase besser exprimiert als Rluc-MR.

Die stabil mit pRluc-MR transfizierten Zellen zeigten ausreichend hohe Lumineszenzwerte, sodass hier eine BRET-Messung durchgeführt werden konnte. Auf die Zugabe von Aldosteron hin ergab sich eine Erhöhung des BRET-Signals gegenüber den Kontrollansätzen. In der mit Rluc-C1 analog durchgeführten Versuchsreihe war keine Veränderung des BRET-Signals messbar. Dies spricht für einen erfolgreichen Versuchsaufbau als Positivkontrolle eines eBRET-Assays für den MR. Mit einer Zunahme des Signals um bis zu 0,056 liegt die Signalthöhe im Bereich der bisher publizierten Ergebnisse für andere Steroidhormonrezeptoren (28;29). Da in den Kontrollansätzen der Mittelwert nicht von Null verschieden ist, kann davon ausgegangen werden, dass unter diesen Bedingungen keine messbare Dimerisierung stattfindet. Dagegen war das BRET-Signal nach Aldosteronstimulation über 90 Minuten ansteigend, der Prozess der Dimerisierung war also nicht direkt nach Hormonzufuhr abgeschlossen, sondern dauerte an. In den vorliegenden Experimenten waren die

Schwankungen der Messwerte jenseits der 90 Minuten zu stark, um verlässliche Aussagen treffen zu können. Hier wäre die Messung von BRET über mehrere Stunden eine mögliche Weiterentwicklung des Assays, die über Art und Dauer der MR-Dimerisierung zusätzlich Aufschluss geben könnte.

Im Hinblick auf die Bedeutung des Hsp90 ist das BRET-Signal in Anwesenheit von Geldanamycin von Interesse. Dieses ähnelt dem Signal nach Aldosterongabe in Signalthöhe und -verlauf. Mögliche Erklärungen sind die Bildung von Dimeren einerseits und von Aggregaten, wie sie nach Überexpression beschrieben sind, andererseits (31). Eine Translokation in den Nucleus fand in Anwesenheit von Geldanamycin nicht mehr statt, wie die Fluoreszenzmikroskopie von Zellen nach Inkubation mit Aldosteron und Geldanamycin zeigt. Eine weitere Erklärung für das BRET-Signal unter Geldanamycin wären zufällige Begegnungen der beiden Fusionsproteine im Zytosol nach Dissoziation von Hsp90. Dagegen spricht die geringe Standardabweichung der Werte, die ähnlich hoch ist wie in den Kontroll- oder Aldosteronansätzen. Die Versuche zur Interaktion von Rluc-C1 und EYFP-MR dagegen stellen ein System dar, in dem das Signal auf zufälligen Interaktionen beruhen muss, da nur einer der beiden Interaktionspartner an den MR gekoppelt ist. Hier sind die Schwankungen des BRET-Signals deutlich höher.

In der Untersuchung der kombinierten Gabe von Aldosteron und Geldanamycin wurde die Bedeutung des Korrekturfaktors  $C_f$  deutlich. Die Aufgabe des  $C_f$  liegt in der Korrektur von Signalen, die in Abwesenheit eines fluoreszierenden Akzeptors entstehen. Im Falle von Rluc-MR führte allerdings die Stimulation mit Aldosteron und Geldanamycin auch in den  $C_f$ -Ansätzen zu einer deutlichen Erhöhung des Verhältnisses  $CPS_{535nm}/CPS_{460nm}$ . Dies wurde weder bei Zugabe der einzelnen Substanzen noch nach Stimulation mit Spironolacton beobachtet. Im Falle von Rluc-C1, also der ungekoppelten Luciferase, hatte keine der Substanzen einen Effekt auf  $C_f$ . Wir verzichteten darauf, die Frage näher zu untersuchen, warum sich das Spektrum der Luciferase in Anwesenheit von Aldosteron und Geldanamycin verschiebt. Für die BRET-Berechnung verwendeten wir daher eine rechnerische Näherung für  $C_f$ . Das BRET-Signal steigt nach diesen Berechnungen nicht signifikant über die Kontrollwerte. Die Stimulation jeweils mit Aldosteron oder Geldanamycin allein bewirkt also eine Signalsteigerung, während die kombinierte Zugabe diesen Effekt nicht zeigt.

Möglicherweise verschiebt sich hier das Luciferase-Spektrum in einen Bereich, in dem Emission und Anregung des BRET-Systems nicht verlässlich funktionieren bzw. kein ausreichend stabiles Signal entstehen lassen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine Interaktion von Aldosteron und Geldanamycin auf der Prä-Rezeptor-Ebene mit dem Effekt, dass beide Substanzen nicht mehr mit dem MR in Wechselwirkung treten könnten.

Auch den Effekt des Aldosteronantagonisten Spironolacton untersuchten wir mit Hilfe von BRET. Spironolacton bewirkte keine Änderung des BRET-Signals und somit keine Dimerisierung des MR. Weiterhin wäre zu prüfen, ob eine Dimerisierung durch zusätzliche Gabe von Aldosteron dennoch erreicht werden könnte. Rogerson und Fuller schlugen die von Spironolacton gehemmte N/C-Interaktion des MR als wichtige Voraussetzung der MR-Homodimerisierung vor, entsprechend einer Annahme für den Androgenrezeptor (32;33). Dies wäre ein Mechanismus, durch den eine Aldosteron-induzierte Dimerisierung durch Spironolacton verhindert werden könnte.

Ein methodischer Aspekt ist der Einfluss des Alters der Zellen auf das BRET-Signal. Es fiel auf, dass in Versuchen mit Zellen älterer Passagen kein Aldosteron-Effekt sichtbar war. Lumineszenz war weiterhin messbar, sodass nicht von einer fehlenden Expression von Rluc-MR ausgegangen werden kann. Möglich wären hingegen eine mangelnde Transfektionseffizienz von pEYFP-MR, eine herabgesetzte Expression oder ein schnellerer Abbau von EYFP-MR. Auch die Aldosteron-Empfindlichkeit könnte herabgesetzt sein. Diese Altersgrenze muss bei der Planung weiterer BRET-Assays mit dem MR bedacht werden.

Nach erfolgreicher Etablierung einer Positiv-Kontrolle für ein BRET-Assay des MR können weitere Anwendungsmöglichkeiten bedacht werden. Von Interesse ist beispielsweise die Untersuchung der Heterodimerisierung mit dem Glukokortikoidrezeptor. Da nach den Ergebnissen des SEAP-Interaktionsassays eine Interaktion von HisGR und Rluc-MR anzunehmen ist, könnte in einem nächsten Schritt die Dimerisierung von GR und MR in einem BRET-Experiment betrachtet werden. Im Hinblick auf nicht genotrope Effekte des MR sind weitere interessante Anwendungen die möglichen Interaktionen beispielsweise mit dem pERK-Signalweg und dem EGF-Rezeptor. Hier können mit BRET direkte Interaktionen zwischen den Proteinen oder auch relevanten Proteinteilen untersucht werden. Mit eBRET besteht außerdem die

Möglichkeit, einen Zeitgang zu betrachten und so Aussagen darüber zu treffen, ob es sich um fortgesetzte oder schnelle Interaktionen handelt. Auch die Einflussnahme anderer Agenzien kann in diesem System direkt untersucht werden. Es sollte letztendlich möglich sein, Signalwege als lückenlose Kette von Proteininteraktionen darzustellen.

## 5. Zusammenfassung

Das Mineralokortikoid Aldosteron ist ein wichtiger Regulator der Salz- und Wasserhomöostase und damit auch des Blutdrucks. Seine physiologische Wirkung entfaltet es über den Mineralokortikoidrezeptor (MR), indem es zu einer Homodimerisierung bzw. Heterodimerisierung mit dem Glukokortikoidrezeptor führt. Zudem sind die pathophysiologischen Wirkungen des Aldosterons beispielsweise auf das Herz-Kreislauf-System in den Focus gerückt, welche zumindest teilweise auch vom MR abhängig sind. Zur weiteren Charakterisierung dieser Signalwege sollen Interaktionen des MR mit möglichen Zielproteinen untersucht werden.

Biolumineszenz Resonanz Energietransfer (BRET) ist eine Methode zur Untersuchung von Proteininteraktionen. Um ein BRET-System für den MR zu erstellen, wurde der MR an eine Renilla Luciferase (Rluc) einerseits und das enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) andererseits gekoppelt. Beide Fusionsproteine wurden auf ihre Funktionalität und Interaktion hin überprüft.

Befinden sich die Fusionsproteine in räumlicher Nähe, regt das von der Luciferase emittierte Licht das fluoreszierende Protein an. Das aus Fluoreszenz und Lumineszenz berechnete BRET-Signal steigt und weist damit auf eine Proteininteraktion hin. Ansätze ohne fluoreszierenden Akzeptor korrigieren unspezifische Signaländerungen.

Wir untersuchten den Effekt von Aldosteron und dem Aldosteronantagonisten Spironolacton sowie von Geldanamycin, das eine Dissoziation des MR von den Hitzeschockproteinen im Zytoplasma bewirkt. Aldosteron führte zu einer Steigerung des BRET-Signals, was die bereits bekannte Interaktion der Fusionsrezeptoren auch im BRET-System bestätigt. Geldanamycin bewirkte ebenfalls eine Signalsteigerung. Die gleichzeitige Gabe der beiden Substanzen sowie die Gabe von Spironolacton bewirkte keine Veränderung des BRET-Signals. Als Negativkontrolle verwendeten wir ein System mit an EYFP gekoppeltem MR und ungekoppelter Luciferase, also ohne Interaktionspartner für den EYFP-MR. Keine der oben genannten Substanzen führte hier zu einer Änderung des BRET-Signals.

Das BRET-System kann damit die Grundlage für die Untersuchung der Interaktionen des MR mit weiteren Zielproteinen darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Klinker R, Pape H, Silbernagl S. Physiologie. 5 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005.
- (2) Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H et al. Mineralocorticoid receptor knockout mice: Pathophysiology of Na<sup>+</sup> metabolism. PNAS 1998; 95(16):9424-9429.
- (3) Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular Mechanisms of Human Hypertension. Cell 2001; 104(4):545-556.
- (4) Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A et al. The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. N Engl J Med 1999; 341(10):709-717.
- (5) Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B et al. Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. N Engl J Med 2003; 348(14):1309-1321.
- (6) Pratt WB, Toft DO. Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. Endocr Rev 1997; 18(3):306-360.
- (7) Fejes-Toth G, Pearce D, Naray-Fejes-Toth A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: Effects of receptor agonists and antagonists. PNAS 1998; 95(6):2973-2978.
- (8) Walther RF, Atlas E, Carrigan A, Rouleau Y, Edgecombe A, Visentin L et al. A Serine/Threonine-rich Motif Is One of Three Nuclear Localization Signals That Determine Unidirectional Transport of the Mineralocorticoid Receptor to the Nucleus. J Biol Chem 2005; 280(17):17549-17561.
- (9) Rogerson FM, Fuller PJ. Mineralocorticoid action. Steroids 2000; 65(2):61-73.
- (10) Savory JGA, Prefontaine GG, Lamprecht C, Liao M, Walther RF, Lefebvre YA et al. Glucocorticoid Receptor Homodimers and Glucocorticoid-Mineralocorticoid Receptor Heterodimers Form in the Cytoplasm through Alternative Dimerization Interfaces. Mol Cell Biol 2001; 21(3):781-793.
- (11) Funder JW. The Nongenomic Actions of Aldosterone. Endocr Rev 2005; 26(3):313-321.
- (12) Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. Molecular and Cellular Endocrinology 2007; 265-266:138-142.
- (13) Luconi M, Francavilla F, Porazzi I, Macerola B, Forti G, Baldi E. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid

- nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids* 2004; 69(8-9):553-559.
- (14) Grossmann C, Benesic A, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Gassner B et al. Human Mineralocorticoid Receptor Expression Renders Cells Responsive for Nongenotropic Aldosterone Actions. *Mol Endocrinol* 2005; 19(7):1697-1710.
  - (15) Mihailidou AS. Nongenomic actions of aldosterone: Physiological or pathophysiological role? *Steroids* 2006; 71(4):277-280.
  - (16) Grossmann C, Gekle M. Non-classical actions of the mineralocorticoid receptor: Misuse of EGF receptors? *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007; 277(1-2):6-12.
  - (17) Krug AW, Grossmann C, Schuster C, Freudinger R, Mildenerger S, Govindan MV et al. Aldosterone Stimulates Epidermal Growth Factor Receptor Expression. *J Biol Chem* 2003; 278(44):43060-43066.
  - (18) Grossmann C, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Voelker K, Gekle M. Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292(6):E1790-E1800.
  - (19) Wallrabe H, Periasamy A. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current Opinion in Biotechnology* 2005; 16(1):19-27.
  - (20) Wu P, Brand L. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal Biochem* 1994; 218(1):1-13.
  - (21) Förster T. *Annalen der Physik* 1948; 2:55-75.
  - (22) Boute N, Jockers R, Issad T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends in Pharmacological Sciences* 2002; 23(8):351-354.
  - (23) Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: Application to interacting circadian clock proteins. *PNAS* 1999; 96(1):151-156.
  - (24) Pflieger KD, Eidne KA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* 2006; 3(3):165-174.
  - (25) Pflieger KDG, Dromey JR, Dalrymple MB, Lim EML, Thomas WG, Eidne KA. Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein-protein interactions in live cells. *Cellular Signalling* 2006; 18(10):1664-1670.

- (26) Promega Corporation. EnduRen Live Cell Substrate Technical Manual. [#TM244]. 2006.
- (27) Pflieger KDG, Seeber RM, Eidne KA. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protocols* 2006; 1(1):337-345.
- (28) Michelini E, Mirasoli M, Karp M, Virta M, Roda A. Development of a Bioluminescence Resonance Energy-Transfer Assay for Estrogen-Like Compound in Vivo Monitoring. *Anal Chem* 2004; 76(23):7069-7076.
- (29) Garside H, Stevens A, Farrow S, Normand C, Houle B, Berry A et al. Glucocorticoid ligands specify different interactions with NF-kappaB by allosteric effects on the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *J Biol Chem* 2004; 279(48):50050-50059.
- (30) Pfau A, Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Benesic A, Gekle M. Ca<sup>2+</sup> but not H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulates GRE-element activation by the human mineralocorticoid receptor in HEK cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007; 264(1-2):35-43.
- (31) Alnemri ES, Litwack G. The steroid binding domain influences intracellular solubility of the baculovirus overexpressed glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *Biochemistry* 1993; 32(20):5387-5393.
- (32) Rogerson FM, Fuller PJ. Interdomain interactions in the mineralocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003; 200(1-2):45-55.
- (33) Langley E, Kemppainen JA, Wilson EM. Intermolecular NH<sub>2</sub>-/Carboxyl-terminal Interactions in Androgen Receptor Dimerization Revealed by Mutations That Cause Androgen Insensitivity. *J Biol Chem* 1998; 273(1):92-101.

## 7. Abbildungsverzeichnis

	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
Abb. 1	BRET, schematische Darstellung	5
Tab. 1	Übersicht über BRET <sup>1</sup> , BRET <sup>2</sup> und eBRET (27)	6
Tab. 2	SEAP-Interaktions-Assay für EYFP-MR und Rluc-MR	11
Tab. 3	SEAP-Interaktions-Assay für His-GR und Rluc-MR	12
Tab. 4	SDS-Polyacrylamidgel	13
Abb. 2	Western Blot für EYFP-MR	18
Abb. 3	Fluoreszenzmikroskopie nach Transfektion mit pEYFP-MR unter Kontrollbedingungen und nach Stimulation durch Aldosteron und durch Aldosteron und Geldanamycin	18
Abb. 4	SEAP-Assay für EYFP-MR	18
Abb. 5	SEAP-Assay für Rluc-MR	19
Abb. 6	SEAP-Assay, SEAP-Aktivität in Abhängigkeit von der Transfektionsmenge pEYFP-MR	20
Abb. 7	SEAP-Interaktions-Assay für pEYFP-MR und pRluc-MR	21
Abb. 8	SEAP-Interaktions-Assay für pHis-GR und pRluc-MR	22
Abb. 9	Korrekturfaktor $C_f$ +/- Aldosteron	24
Abb. 10	Korrekturfaktor $C_f$ +/- Aldosteron und Geldanamycin	25
Abb. 11	Korrekturfaktor in Abhängigkeit von der Zeit und der zugefügten Substanz (+/- Aldosteron und Geldanamycin)	25
Abb. 12	BRET-Signal nach Transfektion mit 0,1 $\mu$ g pEYFP-MR pro Well, +/- Aldosteron	26
Abb. 13	BRET-Signal nach Transfektion mit 0,2 $\mu$ g pEYFP-MR pro Well, +/- Aldosteron	26

Abb. 14	BRET-Signal nach Transfektion mit 0,3 µg pEYFP-MR pro Well, +/- Aldosteron	26
Abb. 15	BRET-Signal +/- Aldosteron	27
Abb. 16	BRET-Signal bei Transfektion mit pRluc-C1, +/- Aldosteron	27
Abb. 17	BRET-Signal (Kontrolle, Aldosteron, Geldanamycin)	28
Abb. 18	BRET-Signal (Kontrolle, Aldosteron, Aldosteron und Geldanamycin)	28
Abb. 19	BRET-Signal +/- Spironolacton	28

## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. Erhard Wischmeyer und Herrn PD Dr. Martin Fassnacht möchte ich mich für die Betreuung meiner Arbeit als Referenten bedanken.

Frau Prof. Dr. Michaela Kuhn danke ich für die freundliche Bereitstellung der Laborräume.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Gekle für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit. Durch konstruktive Kritik und stete Denkanregungen habe ich während meiner Zeit im Physiologischen Institut viel gelernt.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Dr. Claudia Großmann, die trotz ausreichender eigener Arbeitsbelastung immer freundlich, geduldig und kompetent meine Fragen beantwortete. Danke!

Vielen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe Gekle für die stets gute Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und interessierte Diskussionen. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Sigrid Mildener und Frau Ruth Freudinger für die methodische Einarbeitung und unkomplizierte Hilfe bedanken.

## Lebenslauf

<b>Name</b>	Lisa Marie Langenbruch	
<b>Geburtsdatum</b>	22.06.1985	
<b>Geburtsort</b>	Münster	
<b>Schulbildung</b>	1991-1995	A.-v.-Droste-Hülshoff-Grundschule Nienberge
	1995-2003	Schillergymnasium Münster
	14.06.2003	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
<b>Studium</b>	10/2003 – 05/2010	Medizinstudium an der Julius- Maximilians-Universität Würzburg
	12.09.2005	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	10/2005 – 03/2009	Begleitstudiengang Experimentelle Medizin an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg
	21.05.2010	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<b>Praktisches Jahr</b>	02/2009 – 08/2009	Neurologie und Innere Medizin am Klinikum Aschaffenburg
	08/2009 – 12/2009	Innere Medizin und Chirurgie am Sunderby Sjukhus in Luleå, Schweden
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	seit 10/2010	Assistenzärztin an der Klinik für Neurologie am Herz-Jesu-Krankenhaus in Münster-Hiltrup

Münster, 10.11.2010

Lisa Marie Langenbruch