

Aus dem Institut für Tierhaltung und Tierzucht
der Universität Hohenheim
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie

Prof. Dr. R. Claus

**DER GLUCOCORTICOIDREZEPTOR DES SCHWEINS:
HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES POLYKLONALEN ANTISERUMS, SOWIE
STUDIEN ZUR VERTEILUNG DES GCR IM INTESTINALTRAKT VON EBERN UND KASTRATEN**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrarwissenschaften

vorgelegt der
Fakultät Agrarwissenschaften
Universität Hohenheim

von
Monika Gutscher
Diplom Agrarbiologin
aus Schwieberdingen

2002

Die vorliegende Arbeit wurde am 15.07.2002 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2002

Dekan / Prodekan: Prof. Dr. Dabbert / Prof. Dr. Böhm

Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. Claus
Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. Müller
3. Prüfer: Prof. Dr. Besei

Meiner Grossmutter, Johanna Rothacker

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	ÜBERSICHT ZUR PHYSIOLOGISCHEN BEDEUTUNG DER GLUCOCORTICOIDE	2
2.1.1	Bedeutung der Glucocorticoide für den Energiestoffwechsel	3
2.1.2	Wirkungen auf das Immunsystem	5
2.1.2.1	Beeinflussung der Lymphozytenfunktion	5
2.1.2.2	Anti-inflammatorische und antiphlogistische Wirkung der GC	6
2.2	BEDEUTUNG DER GC IN DER REGULATION DES ZELLZYKLUS	7
2.2.1	Regulatorisches Prinzip fortlaufender Umbauprozesse	7
2.2.2	Bedeutung der GC in der Regulation des Mitose-Apoptose-Gleichgewichts	8
2.2.2.1	Beeinflussung der Mitose	10
2.2.2.2	Beeinflussung der Differenzierung	10
2.2.2.3	Beeinflussung der Apoptose	11
2.2.2.4	Dialog und Interaktionen: Mitose - Differenzierung - Apoptose	13
2.3	MECHANISMEN UND REGULATION DER GLUCOCORTICOIDWIRKUNG	14
2.3.1	Bildung und Freisetzung der Glucocorticoide	14
2.3.1.1	Biosyntheseweg der Glucocorticoide	14
2.3.1.2	Regulation der Glucocorticoidsekretion	14
2.3.2	Allgemeine Übersicht über die Rezeptor-vermittelte Wirkung der GCR	17
2.3.2.1	Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors	17
2.3.2.1.1	DNA-Bindung über <i>glucocorticoid responsive elements</i> (GRE)	18
2.3.2.1.2	Protein-Protein-Interaktionen	21
2.3.3	Der GCR als Mitglied der intrazellulären Hormonrezeptoren	22
2.3.3.1	Aufbau des GCR	23
2.3.3.1.1	Aufbau GCR-Gens und der Genprodukte	24
2.3.3.1.2	Funktionelle Eigenschaften der Subdomänen	25
2.3.3.2	Quartärstruktur und Faltung des GCR	27
2.3.3.3	Intrazelluläre Lokalisation des GCR	29
2.3.4	Steuerung der Glucocorticoidwirkung und gewebsspezifische Glucocorticoidsensitivität	31
2.3.4.1	Bioverfügbarkeit des Hormons	31
2.3.4.2	Gewebsspezifische Rezeptorverteilung	31
2.3.4.3	β -Rezeptor Isoform	32
2.3.4.4	Heterodimerization des GCR mit anderen Steroidrezeptoren	32
2.3.4.5	Gewebsspezifische Coaktivatoren	33
2.4	SPEZIELLE BEDEUTUNG DER GLUCOCORTICOIDE IM INTESTINALTRAKT	34
2.4.1	Funktionen des Darms	34
2.4.1.1	Verdauungsphysiologische Aufgaben	34

2.4.1.2	Immunologische Funktion des Darms	35
2.4.2	Kompartimentierung des Darms.....	36
2.4.3	Bedeutung der GC im Rahmen der Regulation des Zellturnovers im Darm.....	38
3	ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN	40
4	MATERIAL UND METHODEN.....	41
4.1	GERÄTE	41
4.2	CHEMIKALIEN, ENZYME, REAKTIONSKITS UND ANTIKÖRPER	42
4.3	BAKTERIENSTÄMME, PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE.....	44
4.4	VERSUCHSTIERE – GEWEBEPROBEN	46
4.4.1	Lebergewebeproben	46
4.4.2	Thymusgewebeproben.....	46
4.4.3	Darmgewebeproben.....	47
4.5	MOLEKULARGENETISCHE TECHNIKEN	49
4.5.1	Isolation von Nukleinsäuren	49
4.5.1.1	RNA Isolation aus Gewebe	49
4.5.1.2	DNA Isolation aus Gewebe	49
4.5.1.3	Plasmidisolierung	50
4.5.1.3.1	Minipräparation	50
4.5.1.3.2	Maxipräparation	50
4.5.1.4	Aufreinigung DNA-haltiger Lösungen.....	51
4.5.1.4.1	PEG-Präzipitation.....	51
4.5.1.4.2	Ethanol-fällung der Sequenzierprodukte	51
4.5.1.4.3	Gelelektrophorese	51
4.5.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	52
4.5.2.1	Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese	52
4.5.2.2	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	52
4.5.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	53
4.5.3.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	53
4.5.3.2	Konzentrationsbestimmung im Agarosegel	53
4.5.4	cDNA-Synthese.....	54
4.5.4.1	Reverse Transkription	54
4.5.4.2	Polymerasekettenreaktion.....	54
4.5.4.2.1	Aktin-Amplifikation - Kontrolle der cDNA-Synthese.....	55
4.5.4.2.2	pGCR-Amplifikation.....	55
4.5.4.2.3	Primerdesign und pGCR Antigenfragment Amplifikation.....	56
4.5.4.2.4	Screening auf positive pGEM und pET Klone	57
4.5.5	Klonierung	58
4.5.5.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	58
4.5.5.2	Klonierung des <i>gcrmr</i> PCR-Produktes in den pETH-2a-Vektor.....	58
4.5.5.3	Klonierung des <i>gcr2, 1</i> PCR-Produktes in den pGEM Teasy Vektor.....	59

4.5.5.4	Transfer von DNA in <i>E. coli</i>	59
4.5.5.4.1	Chemische Transformation in <i>E. coli</i> XL1 Blue.....	59
4.5.5.4.2	Elektroporation.....	60
4.5.5.4.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	60
4.5.5.4.2.2	Transformation	60
4.5.5.5	Plasmidvermehrung	61
4.5.6	Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA	61
4.5.7	Rekombinante Expression	62
4.5.7.1	Kultivierung im Schüttelkolben	62
4.6	PROTEINANALYTISCHE METHODEN.....	63
4.6.1	Herstellung von Cytosol- und Kernfraktionen.....	63
4.6.2	Radioaktive Markierung des cytosolischen GCR	63
4.6.3	Aufreinigung rekombinanter Proteine aus <i>E.coli</i> -Kultur.....	64
4.6.4	Dialyse	65
4.6.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	65
4.6.5.1	Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	66
4.6.5.2	Molekulargewichts-Standards	66
4.6.5.3	Probenvorbereitung und –auftrag.....	67
4.6.5.3.1	Expressionskontrolle.....	67
4.6.5.3.2	Aufreinigung des rekombinanten pGCRmr Proteins.....	67
4.6.5.3.3	Verdünnungsreihe pGCRmr und cytosolisches Protein	68
4.6.5.3.4	Bestimmung der Anti-pGCRmr-IgG-Bindungskapazität	68
4.6.5.3.5	Semiquantitative Bestimmung der GCR Verteilung im Darmtrakt.....	68
4.6.5.3.6	Wanderung des radioaktivmarkierten GCR im Polyacrylamidgel.....	69
4.6.5.4	Bedingungen der Elektrophorese.....	69
4.6.6	Coomassie Blau Färbung.....	69
4.6.7	Western Blotting.....	70
4.6.8	Lokalisierung des ³ H-Dexamethason markierten GCR auf Nitrocellulose Membranen.....	71
4.7	HERSTELLUNG EINES POLYKLONALEN ANTISERUMS	72
4.7.1	Immunisierung.....	72
4.7.2	IgG Präzipitation.....	72
4.8	IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	73
4.8.1	Immunodektion von immobilisierten Proteinen auf Membranen.....	73
4.8.2	Strippen von Membranen.....	73
4.8.3	Nachweis der Antigen Expression in <i>E.coli</i> mit Anti-His-Antikörpern	74
4.8.4	Charakterisierung des Anti-pGCR-IgG.....	76
4.8.4.1	Detektion des pGCRmr-Antigens.....	77
4.8.4.2	Detektion des denaturierten pGCR	77
4.8.4.2.1	Spezifikation der Antigen-Antikörper-Reaktion.....	77
4.8.4.2.2	Optimierung der Antikörperverdünnung.....	78
4.8.4.2.3	GCR Verteilung im Darmtrakt	79
4.8.4.3	Detektion des nativen pGCR - Immunpräzipitation	79
4.8.4.4	Biolumineszenzfilmentwicklung.....	80
4.8.5	Immunhistochemischer Nachweis Des GCR.....	81
4.8.5.1	Herstellung von Gewebsschnitten.....	81
4.8.5.2	Immunhistochemische Färbung des GCR	81

5	ERGEBNISSE.....	84
5.1	ANALYSE DER cDNA DES PORCINEN GCR (2,1 KB).....	84
5.1.1	RNA Isolation und cDNA-Synthese.....	84
5.1.2	Amplifikation eines 2,1 kb cDNA-Fragmentes des porcinen GCR.....	84
5.1.3	Klonierung des pGCR2,1 Fragments in pGEM-Teasy [®] und Transformation in <i>E. coli</i>	85
5.1.4	Plasmidisolierung.....	87
5.1.5	Sequenzanalyse.....	87
5.1.5.1	Sequenzierkonstrukt und Strategie.....	87
5.1.5.2	Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des porcinen GCR (2,1 kb).....	88
5.1.5.2.1	Speziesvergleich des GCR auf nt-Ebene.....	92
5.1.5.2.2	Speziesvergleich des GCR auf as-Ebene.....	93
5.1.5.3	Strukturanalyse des GCR2.1.....	98
5.2	SYNTHESE DES PGCRM ANTIGENS.....	100
5.2.1	Amplifikation des pGCRmr Gens (<i>gcrmr</i>).....	100
5.2.2	Klonierung des pGCRmr Gens in pETH-2a und Transformation in <i>E. coli</i> XL 1 Blue.....	101
5.2.2.1	Restriktionsverdau der <i>gcrmr</i> cDNA und des pET Vektors.....	101
5.2.2.2	Ligation und Transformation.....	101
5.2.3	Sequenzanalyse des pETGCRmr.....	103
5.2.3.1	Nukleotidsequenz des GCRmr Gens.....	103
5.2.3.2	Expressionskonstrukt und Expressionsstrategie.....	103
5.2.4	Transformation des pETGCRmr Konstruktes in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLys.....	105
5.2.5	Expression und Aufreinigung des pGCRmr Proteins.....	105
5.2.5.1	Charakterisierung des Expressionsprodukts mit Anti-His-Antikörpern ...	109
5.3	CHARAKTERISIERUNG DES POLYKLONALEN ANTISERUMS.....	110
5.3.1	Western blot.....	110
5.3.1.1	Western blot Antigen.....	110
5.3.1.2	Western blot mit radioaktiv markiertem Rezeptor und Szintillationsmessung.....	111
5.3.1.3	Western blot mit cytosolischem Thymusprotein.....	112
5.3.1.4	Optimierung der Antikörperkonzentration.....	113
5.3.2	Immunpräzipitation mit aktiviertem und inaktiviertem Rezeptor.....	114
5.3.3	Immunhistochemische Anwendung des Anti-pGCR-IgG.....	117
5.3.4	Charakterisierung des GCR im Intestinaltrakt unter dem Einfluß von Androgenen.....	119
5.3.4.1	Bestimmung des immunreaktiven in den Zellkompartimenten und Darmabschnitten GCR mittels Western blot.....	119
5.3.5	Charakterisierung des immunreaktiven GCR im Intestinaltrakt unter dem Einfluß von Androgenen.....	120

6	DISKUSSION	132
6.1	ZUR BEDEUTUNG DER VERFÜGBARKEIT EINES SCHWEINESPEZIFISCHEN GCR-ANTISERUMS	132
6.2	MOLEKULARGENETISCHE ANALYSE DES PORCINEN GCR	133
6.3	REKOMBINANTE EXPRESSION DES ANTIGENS UND HERSTELLUNG DES POLYKLONALEN ANTISERUMS	134
6.4	CHARAKTERISIERUNG DES POLYKLONALEN ANTISERUMS	134
6.5	REZEPTORVERTEILUNG IM GASTROINTESTINALTRAKT UNTER DEM EINFLUSS VON ANDROGENEN	136
7	ZUSAMMENFASSUNG	140
8	SUMMARY	143
9	LITERATURVERZEICHNIS	146

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AR	Androgenrezeptor
AS	Antiserum
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
cDNA	komplmentäre DNA
C _{ds} DNA	Konzentration doppelsträngiger DNA
C _{ss} DNA	Konzentration einzelsträngiger DNA
C _{RNA}	Konzentration RNA
dATP	2'-Deoxyadenosin 5'-Triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin 5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Deoxyguanosin 5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Deoxythymidin 5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Östrogenrezeptor
EtOH	Ethanol
FPS	Fraktionelle Proteinsynthese
GB	Gesamtbindung
GC	Glucocorticoide
GCR	Glucocorticoidrezeptor
GH	Growth hormone, Wachstumshormon
HBD	Hormonbindungsdomäne
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IGF-I/II	Insulinartiger Wachstumsfaktor I/II
i.v.	intra venös
K _d	Dissoziationskonstante
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MR	Modulatorische Region
mRNA	messenger RNA
NSB	unspezifische Bindung
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pGCR	porciner Glucocorticoidrezeptor
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonucleinsäurespaltendes Enzym
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAD	Transaktivierungsdomäne
Tris	Tri-(hydroxymethyl).aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
(v/v)	Volumenprozent; mL pro 100 mL
(w/v)	Gewichtsprozent; mg pro 100 mL
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indol-β-D-galactosid

1 EINLEITUNG

Die Spezies Schwein ist eine der wichtigsten, landwirtschaftlichen Nutztierarten und trägt mit über 50 % am meisten zur Fleischversorgung der Bevölkerung bei. Dem entsprechend hat die züchterische Entwicklung des Schweins, insbesondere die Steigerung des Fleischansatzes auf Kosten des Fettansatzes in den vergangenen Jahrzehnten eine besondere Förderung erfahren. In Zusammenhang damit haben auch die Regulationsmechanismen anaboler Stoffwechselfvorgänge, d.h. insbesondere die hormonal gesteuerte Förderung der Proteinsynthese und des Proteinansatzes, im Rahmen der Grundlagenforschung besondere Aufmerksamkeit erlangt. Weit weniger ist bekannt, dass durch Züchtung offenbar das Sekretionsniveau der Nebennierenrindenhormone (Glucocorticoide), die das Leithormon für katabole, d.h. proteinabbauende Prozesse, darstellen, erheblich reduziert wurde. Während die Rolle der Glucocorticoide im Rahmen der Bewältigung von Belastungssituationen („Stress“) vielfach bearbeitet wurde, haben die vielfältigen Stoffwechselprozesse, die durch Glucocorticoide wesentlich beeinflusst werden, beim Nutztier nicht die gebührende Aufmerksamkeit erfahren. Insbesondere besteht die Gefahr, dass eine genetische Reduzierung der Cortisolsekretion ihre essentielle Funktion im Rahmen der Steuerung von Zellzyklen und Differenzierungsvorgängen in nahezu allen Organen ins Defizit gebracht hat und damit Ursache für unerwünschte Nebenfolgen der Züchtung auf Fleischleistung sein könnte.

Die Bearbeitung der speziellen Funktion der Glucocorticoide beim Nutztier Schwein bedarf eines geeigneten methodischen Repertoires. Hierfür sind radioimmunologische Meßverfahren für periphere Cortisolkonzentrationen seit längerem etabliert. Auf Gewebesebene war die Darstellung der Cortisolrezeptoren lange Zeit vorrangig auf Bindungsstudien (cytosolischer Rezeptor) angewiesen. Neuerdings ergeben sich durch Entwicklungen der Molekularbiologie Möglichkeiten zur Expression von speziesspezifischen Rezeptorproteinen und darauf aufbauend die Entwicklung von Antiseren und deren Einsatz für immunocytochemische Verfahren. Allerdings sind aufgrund der speziesspezifischen Unterschiede in der Aminosäuresequenz Antiseren von anderen Spezies nicht auf das Schwein zu übertragen.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, zunächst eine Übersicht über die Rolle der Glucocorticoide im Rahmen des Gesamtorganismus vorzustellen und darauf aufbauend das methodische Repertoire durch Erfassung der Aminosäuresequenz des schweinespezifischen Glucocorticoidrezeptors, seiner rekombinanten Expression und die Erzeugung eines Antiserums zu erweitern. Mit Hilfe der erzeugten Antiseren sollten dann erste Nachweisverfahren in Geweben des Schweins dargestellt werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 ÜBERSICHT ZUR PHYSIOLOGISCHEN BEDEUTUNG DER GLUCOCORTICOIDE

Glucocorticoide (GC) spielen eine wichtige Rolle bei der Anpassung des Stoffwechsels an variable Anforderungen und tragen generell zur Aufrechterhaltung unterschiedlichster Stoffwechselbereiche bei. Sie ermöglichen es dem Organismus auf umweltbedingte Veränderungen zu reagieren, in dem sie das Profil der Gentranskription an die aktuelle physiologische Situation anpassen. Diese Wirkung ist als Antwort auf Stresssituationen gut dokumentiert. Physische und emotionale Stressoren führen über die nervöse Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenmark-Achse zunächst zu Katecholamin-abhängigen Sofortreaktionen. Daraufhin wird durch die ACTH vermittelte GC Freisetzung die Homöostase von immunen, nervösen und endokrinen Reaktionen wiederhergestellt und insbesondere die Wiederherstellung verbrauchter Energieressourcen durch die Gluconeogenese aus unterschiedlichsten Substraten veranlasst. Diese Wirkungen auf den Intermediärstoffwechsel werden seit dem 19. Jahrhundert untersucht und sind hinreichend dokumentiert (SCHLAGHECKE, 1992).

Die Wirkungen auf verschiedene Zellen des Immunsystems, dienen dem Organismus als Schutz vor einer Überreaktion bei Infektionen. Diese immunsuppressiven Eigenschaften werden bei einer Reihe von Erkrankungen therapeutisch genutzt und waren zu Beginn der Organtransplantationen die therapeutische Basis, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern.

Neben den Aufgaben zur Stressbewältigung und Immunsuppression, durch hohe GC-Konzentrationen ausgelöst, haben „physiologische“ Konzentrationen essentielle Regulationsaufgaben im Rahmen der Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen. *In vitro* Studien zeigen zudem, dass GC auch in der Regulation des Zelltods (Apoptose) beteiligt sind, woraus sich ihre katabole Wirkung erklärt. Die Bedeutung dieser Effekte im Rahmen der Zellzyklusregulation ist jedoch weiter durch *in vivo* Versuche zu belegen und bedarf eines ergänzenden analytischen Instrumentariums.

2.1.1 BEDEUTUNG DER GLUCOCORTICOIDE FÜR DEN ENERGIESTOFFWECHSEL

Der Name Glucocorticoide weist bereits auf ihre zentrale Bedeutung in der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels hin, die sich in der Beeinflussung der Gluconeogenese manifestiert (MUNCK & GUZRE, 1986; DÖCKE, 1996).

GC tragen zur Bereitstellung von Energie bei, indem sie die hepatische Glucoseproduktion durch ihre katabole Wirkung auf den Protein-, Fett- und Nukleinsäurestoffwechsel in peripheren Geweben wie Muskel, Haut, Fettgewebe, lymphatischen Geweben und Bindegewebe steigern und somit die Substratverfügbarkeit verbessern. Diese freigesetzten glucoplastischen Substrate fließen über Pyruvat oder den Zitronensäurezyklus in die Gluconeogenese, d.h. die Glucose- und Glykogenproduktion aus Proteinen in der Leber ein und tragen damit zur Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels bei. Die katabole Wirkung auf das Fettgewebe beruht auf einer GC vermittelten Änderung der Sensitivität gegenüber lipolytischen Hormonen wie z.B. Wachstumshormon (GH). Freigesetztes Glycerol wird über Triosephosphat in die Gluconeogenese eingeschleust, freie Fettsäuren über Acetyl-CoA (Abbildung 1:).

In der Leber werden gluconeogenetische Schlüsselenzyme, wie die Glucose-6-Phosphatase, die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPCK), die Serin-Dehydratase und Tyrosin-Aminotransferase durch GC aktiviert. Die gesteigerte Enzymaktivität resultiert aus einer verbesserten Gentranskription (MILLER & TYRREL, 1995; BERGER et al., 1996; ORTH & KOVACS, 1998). Bei Mäusen mit einem Gendefekt für den Glucocorticoidrezeptor ist die Induktion gluconeogenetischer Enzyme beeinträchtigt (TRONCHE et al., 1998). Somit leiten GC in peripheren Geweben eine katabole Stoffwechselsituation ein, während sie in der Leber eine proteinanabole Wirkung aufweisen (DÖCKE, 1996).

Die neu gebildete Glucose wird zum Teil als Glykogen in der Leber gespeichert oder je nach Bedarf direkt in die Blutzirkulation abgegeben. Aus einer Überkompensation durch vermehrte Ausschüttung des antagonistisch wirkenden Insulins kann durch gleichzeitige Herabsetzung der Insulinempfindlichkeit in der Peripherie die Stammfettsucht resultieren (TRONCHE et al., 1998). Die Glucoseaufnahme wird durch die Synthesehemmung von Glucose-transportmolekülen stark reduziert und somit die Glucoseutilisation gehemmt (LENZEN et al., 1984; SCHLAGHECKE, 1992). Zudem wirken GC differenzierend auf neu gebildete Adipozyten (RAMSAY et al., 1989).

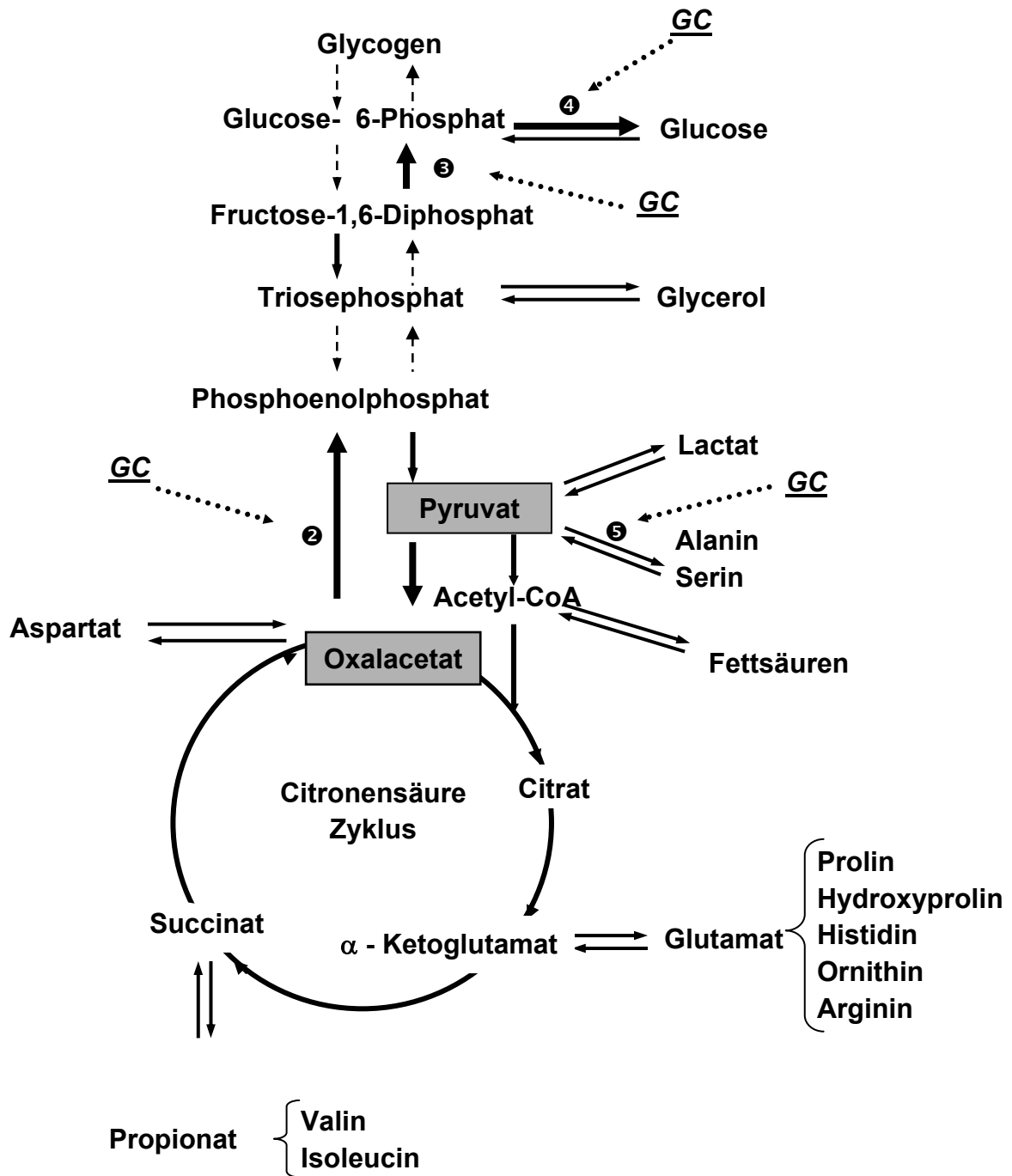


Abbildung 1: Einmündung glucoplastischer Substanzen in den Syntheseweg der Gluconeogenese. Schlüsselenzyme sind durch dicke Pfeile gekennzeichnet: ❶ Pyruvat-Carboxylase, ❷ Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, ❸ Fructose-1,6-Diphosphatase, ❹ Glucose-6-Phosphatase, ❺ Serin-Dehydratase. Direkte GC-Beeinflussung von Enzymaktivitäten ist über gestrichelte Pfeile dargestellt.

2.1.2 WIRKUNGEN AUF DAS IMMUNSYSTEM

Neben ihrer zentral katabolen Rolle in der Regulation des Stoffwechsels, besitzen GC in pharmakologischer Dosierung eine immunsuppressive und anti-inflammatorische Wirkung und führen zu einer ausgeprägten Involution der lymphatischen Organe (SCHRECK, 1993). Diese immunsuppressiven Eigenschaften der GC werden seit Ende der 50er Jahre bei einer Reihe von Erkrankungen therapeutisch genutzt. Indikationsgebiete sind z.B. allergische Erkrankungen (Colitis ulcerosa, Enteritis regionalis Crohn), speziell auch Autoimmunerkrankungen, Lungenerkrankungen (Asthma bronchiale), Blutkrankheiten (Leukämie), Haut- und Augenerkrankungen sowie (früher) Organtransplantationen (SCHLAGHECKE, 1992).

Erste GC-Applikationsversuche wurden bereits 1936 von SEYLE an Nagern durchgeführt und dabei zytolytische Effekte bei Thymozyten und leukämischen Zellen beobachtet. *In vitro* Versuche mit lymphoiden Zelllinien zeigten, dass GC die Mediatoren der letalen Effekte sind. Im Umkehrschluss konnten TRONCHE et al. (1998) erstmals durch Knock-out Mäuse, die einen Defekt im Glucocorticoidrezeptorgen aufweisen, die Apoptose von T-Zellen aufheben.

1.1.1.1 BEEINFLUSSUNG DER LYMPHOZYTENFUNKTION

Cytokine umfassen Monokine, von Monozyten und Makrophagen stammende Mediatoren und Lymphokine, von Lymphozyten stammende Mediatoren (TURNBULL & RIVIER, 1999). Sie vermitteln viele Prozesse der spezifischen Immunreaktion, wie z.B. B- und T-Zellwachstum und Differenzierung und Aktivierung von Effektorzellen und spielen somit eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems (DÖCKE, 1996). Sie induzieren die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Zielgenen modulieren. Die immunsuppressive Wirkung der GC erfolgt über die Repression der Cytokinsynthese durch genomische und nicht-genomische Aktionen, wodurch diese in ihrer Wirkung gehemmt werden (REFOJO et al., 2001). Beeinflusst werden z.B. folgende Cytokine über Synthesehemmung oder Hemmung der Wirkung: Bradykinin, *tumor necrosis factor (TNF)*, *transforming growth factor (TGF)- β* , Eicosanoide, γ -Interferon, Interleukin I (IL-1) und Interleukin II (IL-2) (SCHLAGECKE, 1989; SCHAEFFER et al., 2000).

Ein Mechanismus bei T-Zellen ist die Hemmung des *nuclear factor kappa B* (NF- κ B). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle in der Cytokin-Genexpression einnimmt (ORTH & KOVACS, 1998, ALMAWI & MELEMEDJIAN, 2002; HECK et al., 1997). Allerdings fordern Cytokine selbst GC an, um den Organismus vor einer immunen Überreaktion zu schützen. Interessant stellt sich die Beeinflussung der B-Zell Entwicklung dar. Während die Aktivierung und anschließende Proliferation durch GC inhibiert werden, reagieren Zellen im

Differenzierungsstadium weniger sensitiv. Die Produktion der Immunglobuline wird sogar verbessert. In einigen lymphoiden Geweben kann der Zelltod von immaturren B-Zellen durch GC induziert werden. Dieses Phänomen der Stammzellapoptose ist auch in anderen Organsystemen, wie z.B. im Darm bekannt. Bei Monozyten wird durch Hemmung der Wirkung des *colony stimulating factors* (CSF) die Proliferation gestoppt, zudem wird ihre Differenzierung zu Makrophagen und deren phagozytotische und zytotoxische Funktion gehemmt. Der Einfluss basaler Konzentrationen auf das Immunsystem wird weiter stark diskutiert.

2.1.2.1 ANTI-INFLAMMATORISCHE UND ANTIPHLOGISTISCHE WIRKUNG DER GC

GC hemmen das Einwandern von Zellen und Flüssigkeit aus dem intravaskulären Raum in das Gewebe. Diese anti-inflammatorischen Effekte beruhen zum Teil auf der Inhibierung der Histaminwirkung, wodurch die vaskuläre Permeabilität reduziert und die Bildung von Ödemen unterbunden wird (SCHLAGHECKE, 1989). Weiterhin wird die vasodilatorische Wirkung von Prostaglandin (PG) unterdrückt. Im Detail: durch Inhibition der Phospholipase A, ein Schlüsselenzym des Cyclooxygenasewegs, hemmen GC die Synthese von PG und anderen Arachidonsäure Derivaten. Es ist nicht geklärt, ob GC die Phospholipase A oder die Phospholipase A-Inhibitor Biosynthese regulieren oder beides. Ein weiterer Mechanismus ist die Hemmung des Plasminogen Aktivators (PA), der Plasminogen zu Plasmin aktiviert, welches Plasmaglobulin in potente Kinine spaltet, die vasodilatorisch wirken und die Kapillarpermeabilität erhöhen. Die antiphlogistische Wirkung wird durch Hemmung der Fibroblastenproliferation und der Proliferation entzündlichen Granulationsgewebes, sowie der Ablagerung von Kollagensubstanzen unterstützt (DÖCKE, 1996).

Generell kann den GC eine Dosis-Wirkungsbeziehung zugeschrieben werden. Während der Einfluss pharmakologischer Dosen und hoher endogener GC Konzentrationen z.B. bei Stresssituationen gut beschrieben ist, ist über die Wirkung und Bedeutung basaler Konzentrationen wenig erforscht. Es ist jedoch unumstritten, dass sie an der Regulation des Mitose-Apoptose-Gleichgewichts maßgeblich beteiligt sind.

2.2 BEDEUTUNG DER GC IN DER REGULATION DES ZELLYKLUS

2.2.1 REGULATORISCHES PRINZIP FORTLAUFENDER UMBAUPROZESSE

Die Anpassung des Körpers an den jeweiligen Entwicklungszustand und verschiedene Umwelteinflüsse wird durch das regulatorische Prinzip fortlaufender Umbauprozesse, dem Turnover, ermöglicht (CLAUS & WEILER, 1992). Bei Turnoverprozessen unterscheidet man zwischen Inaktivierung und Neusynthese von Enzymen und Ab- und Aufbau ganzer Zellen. Protein- und Zellturnover resultieren aus den in allen Lebensabschnitten, zwar in unterschiedlichem Verhältnis, aber stets parallel ablaufenden anabolen Stoffwechselprozessen, wie Proteinsynthese und Zellteilung und katabolen Stoffwechselprozessen, wie Proteinabbau und Zelltod (SIMON, 1989).

Proteine, die als Enzyme oder in anderer Form im Organismus vorliegen, sind Alterungsprozessen und Verschleiß unterworfen und müssen ständig ausgetauscht werden. Bei Zellen mit hohem Differenzierungsgrad, die also ihre Teilungsfähigkeit verloren haben (Nervenzellen, Herzmuskelzellen), werden die funktionellen Anforderungen durch den intrazellulären Proteinturnover gewährleistet. Die meisten Proteine befinden sich somit in einem dynamischen Stadium des konstanten Turnovers, wodurch die Akkumulation von Proteinen mit Translationsfehlern verhindert wird (SIMON, 1989).

Nicht nur Zellbestandteile, sondern auch ganze Zellen unterliegen Umbauprozessen. In Abhängigkeit von metabolischer Aktivität, mechanischer Beanspruchung und Belastung durch Antigene haben Gewebe unterschiedliche Turnoverraten. Deckepithelien unterliegen einer starken Beanspruchung und weisen somit auch den höchsten Zellturnover auf. So werden im Dünndarmepithel täglich bis zu 79% der Zellen ausgetauscht (BUCHER & WARTENBERG, 1991). Dies spiegelt sich auch in der hohen fraktionellen Proteinsynthese (FPS) dieses Organs wieder. Sie gibt den prozentualen Anteil der pro Tag neu synthetisierten Proteinmasse eines Organs an. Im Dünndarm werden in Abhängigkeit des Segments pro Tag zwischen 40 und 56% der Proteine neu synthetisiert (SIMON, 1989), während z.B. im Herz die FPS 7% und in der Skelettmuskulatur 5% beträgt (GARLICK et al., 1976).

Zellen, die durch Verschleiß und Alterung geschädigt sind, werden abgebaut und der Verlust muss durch die Entstehung neuer Zellen kompensiert werden. Dem Zellturnover liegt somit die Bildung neuer Zellen, die Aufnahme ihrer maturaen Funktion und der Abbau der gealterten, bzw. geschädigten und verschlissenen Zellen zugrunde. Realisiert wird dies in den Geweben durch Mitose, Differenzierung und Apoptose. An der Regulation dieser Mechanismen

sind GC maßgeblich beteiligt (Abbildung 2:). Auf ihren Einfluss soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

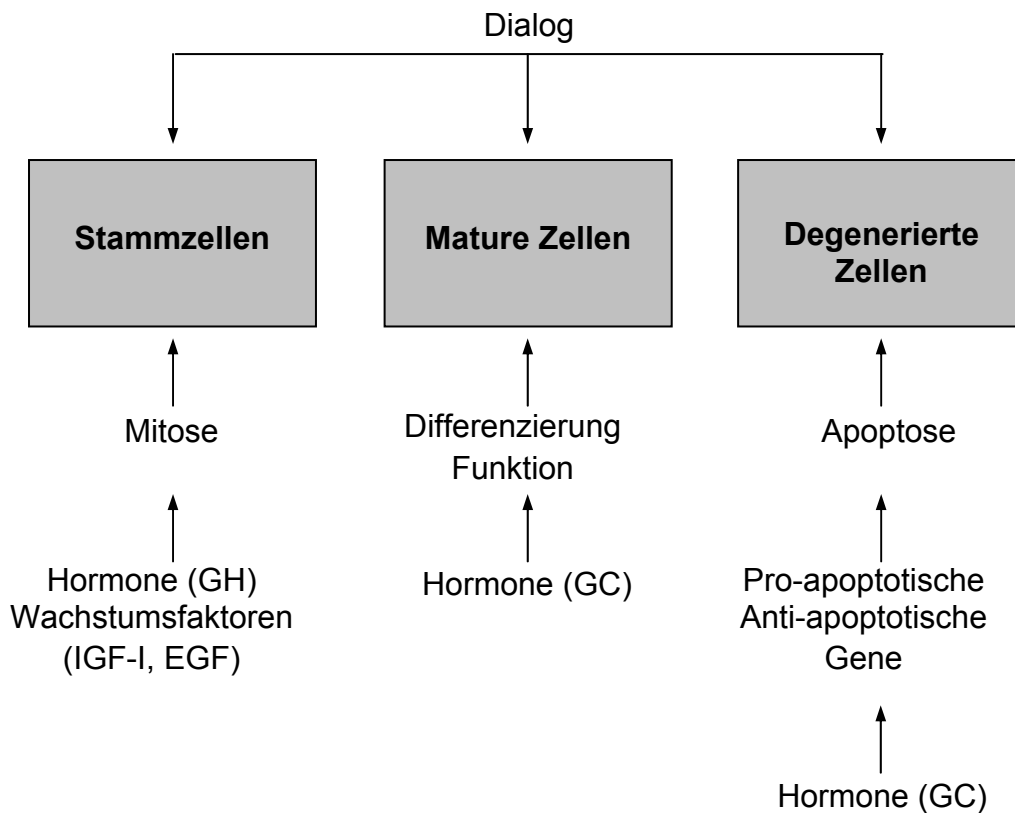


Abbildung 2: Regulation des Zellturnovers

2.2.2 BEDEUTUNG DER GC IN DER REGULATION DES MITOSE-APOPTOSE- GLEICHGEWICHTS

In Organismen ist die Zellteilungsrate ein streng regulierter Prozess. Generell erfolgt die Zellteilung erst nach dem Erhalt eines Signals, welches die Zelle in die aktive Phase des Zellzyklus überführt (Überschreiten des V-Punktes). Der Zellzyklus wird in vier Abschnitte untergliedert (Abbildung 3).

In der G_1 Phase ($G = \text{gap}$) bereitet sich die Zelle auf die DNA Replikation vor, hier werden die entsprechenden Proteine synthetisiert, wobei sich die Zelle vergrößert. Überschreitet die Zelle einen Restriktionspunkt (R) am Ende dieser Phase, führt dies zum Durchlauf des gesamten Zellzyklus. In der zur Teilung bestimmten Zelle, werden während der anschließenden S Phase DNA-Polymerasen aktiviert und das Genom repliziert. In der G_2 Phase bereitet sich die Zelle auf die Teilung vor, wobei nochmals mittels Reparaturenzymen die replizierte

DNA überprüft wird. Die M Phase entspricht der Zellteilung durch Mitose oder Meiose. Direkt danach entscheidet sich in welcher Richtung sich die Zelle weiterentwickelt: entweder tritt die Zelle wieder in den Zellzyklus ein und teilt sich erneut; oder die Tochterzelle schlägt den Weg der Differenzierung ein, in der sie für ihre spezielle Funktion in einem Gewebe ausreift. Diese G_0 -Phase stellt die nicht-proliferative Phase („Ruhephase“) des Zellzyklus dar, während der die Zelle ihre charakteristische Funktion ausübt bzw. eine Pause bis zur nächsten Teilung einhält. Für bestimmte Zellen, so die Nervenzellen, bedeutet die Ausdifferenzierung das Ende der Teilungsfähigkeit, andere Zelltypen können auch danach wieder in den Zellzyklus eintreten (BERRIDGE, 1986). Die Rückkehr in den Zellzyklus wird durch Kompetenzfaktoren ausgelöst. Kompetenzfaktoren sind Wachstumsfaktoren die in der G_0 und frühen G_1 Phase wirken und die Zelle auf die DNA-Replikation vorbereiten. Progressionsfaktoren, ebenfalls Wachstumsfaktoren, werden benötigt, damit die Zelle nicht ausdifferenziert wird, sondern in die S-Phase übergeht. Eine gute Übersicht liefert PIMENTEL (1994).

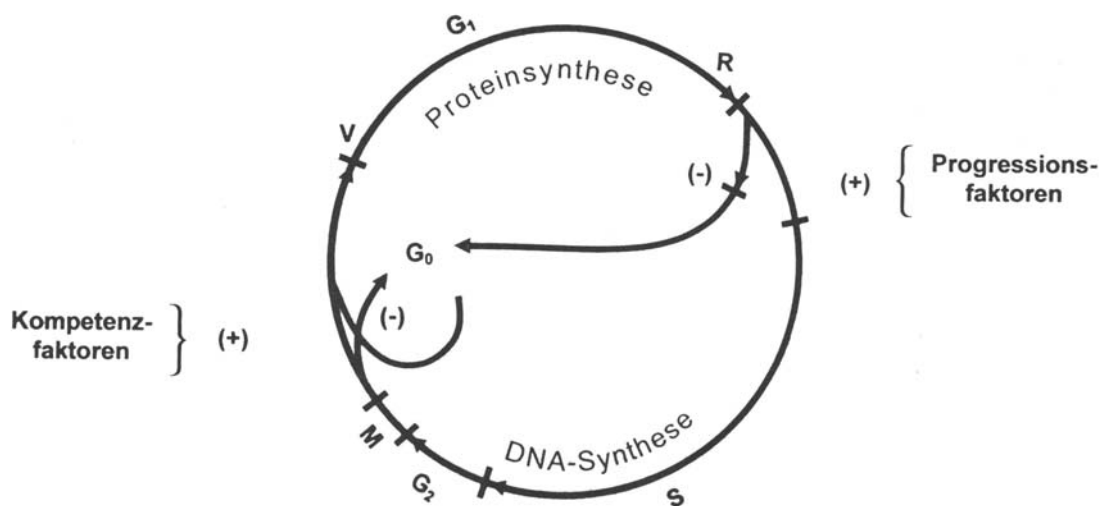


Abbildung 3: Wirkung von Kompetenz- und Progressionsfaktoren im Zellzyklus (REDDY, 1994)

Die dargestellten Zellzykulszusammenhänge treffen generell für jene Zellen zu, bei denen nach einer gewissen Arbeitsphase (G_0), z. T. zur Reparatur von Zellproteinen, eine Wiederaufnahme der Teilungsaktivität erfolgt. Betroffen sind auch Stammzellen im Rahmen von Vermehrungszyklen, bei denen jedoch die G_0 -Phase funktionell bedeutungslos ist. Bei spezialisierten Zellen wird durch die Differenzierung stattdessen bereits die Apoptose determiniert.

2.2.2.1 BEEINFLUSSUNG DER MITOSE

Die Prozesse der Zellteilung werden stark durch Wachstumsfaktoren beeinflusst, welche als Progressions- und Kompetenzfaktoren fungieren. Aber auch GC spielen eine Rolle. Nach TRONCHE et al. (1998) ist bei fehlender Glucocorticoidrezeptor Funktion die Proliferation von Erythrozyten Vorläuferzellen beeinflusst, so dass deren Erneuerung beeinträchtigt wird. GC modulieren die Expression verschiedener mitogener Faktoren. RYDZIEL & CANALIS (1995) beschreiben die Hemmung der *Insulin like growth factor II* (IGF-II)-Bildung in der G₀/G₁-Phase bei gesteigerter GC-Sensitivität durch verstärkte Expression des Glucocorticoidrezeptors. Bei Dexamethasonapplikation erfolgt so eine beschleunigte apoptotische Antwort. Der GC-induzierte Zelltod ist allerdings nicht einfach die Konsequenz der GC-induzierten Unterbrechung des Zellzyklus, sondern einer Aktivierung von Apoptosemechanismen (KOFLER, 2000).

In der G₂/M Phase ist der Grad der Hyperphosphorylierung, welche für die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors von Bedeutung ist, gering und in der S-Phase hoch. Daher weisen in der G₂ Phase viele Zelltypen bei Säugetieren eine GC Unempfindlichkeit auf. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung und bestimmte Funktionen des Glucocorticoidrezeptors der Kontrolle des Zellzyklus unterworfen sind (BODWELL et al., 1998; HSU & DEFRANCO, 1995).

2.2.2.2 BEEINFLUSSUNG DER DIFFERENZIERUNG

Glucocorticoide spielen eine wichtige Rolle in der Reifung/Entwicklung von Organen in Zusammenhang mit dem Geburtsvorgang. Bekannte Beispiele für solche Organe sind die Lunge und der Darm (COLE et al., 1995; BOLT et al., 2001; TRONCHE et al., 1998). *In vitro* Versuche mit Adipozyten (RAMSAY et al., 1989) und Osteoblasten (RAISZ & FALL, 1990) zeigten, dass GC für die Entwicklung zu maturaen funktionsfähigen Zellen notwendig sind. Auch in kompensatorischen Wachstumsphasen deutet ein gleichzeitiger Anstieg von *Insulin like growth factor I* (IGF I) und GC im Plasma auf die Differenzierungsfunktion hin (GUTSCHER, 1996). Aussagefähige *in vivo* Studien zur Differenzierung wurden an Knock-out Mäusen durchgeführt, bei denen die GC-Synthese beeinträchtigt ist (BERGER et al., 1996; GELEY et al., 1997). Der Arbeitsgruppe um TRONCHE et al. (1998) gelang es bei Mäusen verschiedene Knock-out Modelle des Glucocorticoidrezeptorgens zu konstruieren. Mäuse mit diesen Defekten wurden mit nicht ausgereiften Lungen geboren oder starben bereits im Embryonalstadium. Bei fetalen Mäusen mit hypoplastischen Lungen wurde eine verringerte Glucocorticoidrezeptorkonzentration festgestellt (CHINOY et al., 2001).

Beim Schwein wiesen SANGILD et al. (1995) ebenfalls eine differenzierungsfördernde Wirkung der GC im Verdauungstrakt nach. Die Aktivität

einer Vielzahl von Verdauungsenzymen (GELEY et al., 1997), die Expression membranständiger Transporterproteine (KIELA et al., 2000), sowie Proteine, die an der Gluconeogenese maßgeblich beteiligt sind (TRONCHE et al., 1998; BERGER et al., 1996; ORTH & KOVACS, 1998; LENZEN et al., 1984; SCHLAGHECKE, 1992) werden durch GC initiiert und reguliert.

GC wirken differenzierungsfördernd indem sie direkt die Transkription zelltypspezifischer Enzyme stimulieren. Sie scheinen aber auch an der Unterdrückung eines vorzeitigen Zelltods beteiligt zu sein und wirken somit positiv auf die Überlebensdauer und Funktionsbereitschaft von Zellen. *In vivo* bildet der aktivierte GCR mit dem Tumorsuppressor p53 einen Komplex, wodurch sich beide Faktoren gegenseitig inhibieren. GC hemmen dadurch p53 abhängige Funktionen, wie die Transaktivierung, Aktivierung von pro-apoptotischen Genen (*bax*) bzw. die Hemmung von anti-apoptotischen Genen (*bcl2*) und unterstützen somit die Unterbrechung des Zellzyklus und der Apoptose. Der p53-GCR-Komplex kann durch GCR Antagonisten gelöst werden. Dies führt zur Akkumulation von p53 im Nukleus, Unterbrechung des Zellzyklus und Apoptose (SENGUPTA et al., 2000). Andererseits ist die Aufnahme der Funktion gleichzeitig mit dem Verlust der Fähigkeit zur Zellteilung verbunden, und bedeutet somit auch den Verschleiß und letztendlich den Zelltod.

2.2.2.3 BEEINFLUSSUNG DER APOPTOSE

Differenzierte Zellen mehrzelliger Organismen verfügen über einen Mechanismus, der über die Aktivierung eines genetischen Programms zur Selbstzerstörung, also dem Zelltod führt. Dieser „programmierte“ Zelltod wird als Apoptose bezeichnet und erfolgt durch die Aktivierung von endogenen Proteasen und Endonukleasen und wird von einer verminderten Mitochondrienfunktion begleitet. Die ursprüngliche Definition der Apoptose beruht auf der morphologischen Beschreibung: die Zellen schrumpfen, sie verlieren den Kontakt zu benachbarten Zellen, die Zellmembran wirft sich auf, das Chromatin kondensiert und die Membran des Zellkerns wird aufgelöst. Benachbarte phagozytische Zellen vollenden die Degradation. Zellen, die nicht sofort phagozytiert werden, zerfallen in kleinere Zellpartikel und werden als apoptotische Körperchen bezeichnet (WYLLIE, 1981; THOMPSON, 1994; MUZIO, 1998). Eine charakteristische Eigenschaft ist die Elimination von sterbenden Zellen ohne inflammatorische Prozesse. Im Vergleich ist das nekrotische Absterben, ausgelöst z.B. durch bestimmte toxische Substanzen, mit dem Anschwellen der Zellen, einem frühzeitigen Verlust der Integrität der Zellmembran und der Induktion einer inflammatorischen Reaktion verbunden.

In den meisten Geweben, scheint das Überleben der Zellen von „Überlebenssignalen“ benachbarter Zellen und der extrazellulären Matrix

unterstützt zu werden. Zellen werden konstant oder in regelmäßigen Intervallen durch das Ausbleiben dieser Signale auf Selbstzerstörung programmiert. In vielen Fällen jedoch scheint die Apoptose unter der Kontrolle extrazellulärer Liganden, wie z.B. Steroiden zu stehen (PIMENTEL, 1994; THOMPSON, 1994). Dass GC an der Induktion der Apoptose beteiligt sind, zeigen frühe Applikationsstudien an Ratten bei denen eine Thymusinvolution beobachtet wurde. Die molekularen Mechanismen, die dem GC-induzierten Zelltod zugrunde liegen sind nicht vollständig geklärt. Die Arbeitsgruppen um KOFLER (2000) und RAMDAS et al. (1999) nehmen an, dass eine Hochregulation des Glucocorticoidrezeptors, durch positiven *Feedback*, in sensitiven Zielzellen wahrscheinlich den kritischen Schritt darstellt. In den letzten Jahren wurden zwei Mechanismen, die letztendlich die Apoptose bedingen erforscht. Über so genannte membranständige Todesrezeptoren, einen Liganden stellt z.B. der *tumor necrosis factor* (TNF) dar, erfolgt die Aktivierung von Caspasen, das sind Proteinasen, die für die Apoptose entscheidend sind. Der zweite, weit komplexere und weniger gut beschriebene Mechanismus involviert die Mitochondrien und führt neben dem Zusammenbruch der zentralen metabolischen Stoffwechselsituation, letzten Endes auch zur Aktivierung von Caspasen. Inwieweit GC durch Transaktivierung oder Transrepression der Genexpression in dieses Apoptosemechanismen eingreifen ist nicht geklärt. Eine Beteiligung ist jedoch unumstritten.

Ob GC auch typische apoptotische Gene direkt induzieren (Kandidaten-Gene) oder über die Repression onkogener Gene wirken, ist bislang nur vereinzelt geklärt (Übersicht: KOFLER, 2000). Eventuell besteht eine wechselseitige Beeinflussung von GC und dem Proto-Onkogen *bcl-2*, einem Gegenspieler der Apoptose. Die GC vermittelte Apoptose einer Lymphomzelllinie der Maus wird durch die Expression von *BCL-2* unterdrückt (CARSON-LESLIE et al., 1994). Die Überexpression von *bcl-2* kann Neuronen des Sympathikus vor dem Zelltod schützen und eine geringe *bcl-2* Expression wird bei Prostatakrebs diagnostiziert. Das Protein spielt somit eine wichtige Rolle in der Zellentwicklung und -reifung und ist wahrscheinlich in die Prozesse, die letztendlich zur Differenzierung der Zellen führen involviert. Es wird vermutet, dass *bcl-2* und die Mitglieder dieser Familie den mitochondrialen Pfad der Apoptose kontrollieren (Übersicht KOFLER, 2000). Auch der Tumorsuppressor p53 steht zur Diskussion. Mäuse mit einem p53-Defekt zeigen jedoch eine normale Todesantwort auf GC (CLARKE et al., 1993). Eine zentrale Rolle in der GC-induzierten Apoptose wird dem Proto-Onkogen *c-myc*, das für einen sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor kodiert, zugeschrieben. In einer Übersicht von THOMPSON (1994) sind die Auswirkungen einer GC Behandlung verschiedener lymphoider Krebszelllinien beschrieben: eine verringerte Expression der Proto-Onkogene *c-myc*, *c-myb* und *c-ki-ras* wurde nachgewiesen. Eine direkte Beeinflussung der Transkription typischer apoptotischer Gene, wie z.B. *bax*, *bik*, *bak*, *bcl-x*, *bad*, *p53*, *c-jun* und *hrk* durch GC konnte bislang nicht gezeigt werden.

2.2.2.4 DIALOG UND INTERAKTIONEN: MITOSE - DIFFERENZIERUNG - APOPTOSE

Die Vitalität eines Organismus beruht auf der Aufrechterhaltung und der Erneuerung verschiedener Gewebe, nicht nur im adulten Stadium sondern auch bei der Embryogenese und Ontogenese (WHITE, 1993; HOLBROOK et al., 1996). Die Kontrolle über die Zellzahl wird dabei durch die Balance von Zellbildung und Zelltod bestimmt. Zellverluste werden generell unter normalen physiologischen Bedingungen durch eine entsprechende Mitoserate ersetzt (POTTEN et al. 1997). Zwischen Zellwachstum und Zelltod besteht somit ein Gleichgewicht (QUE & GORES, 1996). Diese Prozesse werden durch ein Netzwerk an Interaktionen unterschiedlichster Faktoren reguliert (PODOLSKY, 1994). Für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts sind einerseits mitogene Faktoren, vor allem Wachstumsfaktoren verantwortlich, dem entgegen wirken die differenzierungsfördernden Faktoren, allen voran die GC, die letztendlich auch die entscheidende Rolle bei der Apoptose spielen. Ein Ungleichgewicht z.B. bei verstärkter Apoptose, führt zur Atrophie des Gewebes, während eine verzögerte Apoptose in einer Gewebeproliferation resultiert. Tumorwachstum wird z. T. auch auf Apoptosedefizite zurückgeführt (QUE & CORES, 1996).

Es muss also ein enger Dialog zwischen mitogenen Signalen und Differenzierungsvorgängen bestehen. Einen Hinweis darauf liefern Untersuchungen von CLAUS & WEILER (1996). Der Verlauf von IGF-I, Cortisol und Osteocalcin, als Differenzierungsmaker für Osteoblasten, korreliert in präpubertalen Jungsauen eng. Zudem kann in kompensatorischen Wachstumsphasen ein gleichzeitiger Anstieg, sowohl von IGF-I als auch von GC im Plasma beobachtet werden (GUTSCHER, 1996). Weiterhin wurde in der Promotorregion des GH-Gens eine DNA-Bindungsstelle für den GCR, ein *glucocorticoid responsive element* (GRE) nachgewiesen (GELEY et al., 1997). GC wirken differenzierungsfördernd auf somatotrope Hypophysenzellen und steigern damit die Wachstumshormon (GH) Bildung. GC und IGF-I wirken in synergistischer Weise auf Fibroblasten (GIROCINO & SMITH, 1995).

Auf welche Weise zwischen Wachstumsfaktoren und GC ein Dialog besteht und welche Mediatoren daran beteiligt sind ist noch weitgehend unbekannt. Im Immunsystem existiert eine wechselseitige Beziehung zwischen GC und IL-1 (SCHLAGECKE, 1989). Von neu gebildeten Monozyten wird Interleukin-1 β synthetisiert. Das Cytokin stimuliert die CRH-Produktion im Hypothalamus und in der Folge die vermehrte ACTH- und Cortisolfreisetzung. IL-1 β fordert somit GC zur Differenzierung an (NAVARRA et al. 1991). Weiterhin sind periphere Lymphozyten in der Lage ACTH zu produzieren und freizusetzen (SCHLAGECKE, 1989).

2.3 MECHANISMEN UND REGULATION DER GLUCOCORTICOIDWIRKUNG

2.3.1 BILDUNG UND FREISETZUNG DER GLUCOCORTICOIDE

2.3.1.1 BIOSYNTHESEWEG DER GLUCOCORTICOIDE

Glucocorticoide (GC) werden in der Nebennierenrinde synthetisiert. Ausgangssubstanz der Biosynthese ist Cholesterol, einem aus drei Cyclohexan- und einem Cyclopentanring bestehenden Molekül, das seinerseits *de novo* aus Acetat gebildet, aus intrazellulärem Cholesterylester mobilisiert oder aus Lipoprotein Cholesterol des Plasmas importiert wird. Aus dem Grundgerüst des Cholesterols entstehen durch enzymatische Modifikationen unterschiedlich reaktive Steroide, in dem ungesättigte C-C-Bindungen in die Ringe eingefügt oder Hydroxyl- und Ketongruppen an spezifische Kohlenstoffatome angehängt werden. Eine gute Übersicht liefern ORTH & KOVACS (1998). Der Biosyntheseweg mit seinen Verzweigungen zur Herstellung der verschiedensten Steroide wie GC, Mineralocorticoide (MC) und adrenale Androgene, sowie ihre Struktur, die Struktur ihrer biosynthetischen Vorläufer und die daran beteiligten Enzyme sind in Abbildung 4 dargestellt. Beim Menschen und beim Schwein ist das quantitativ vorherrschende Glucocorticoid Cortisol, bei der Ratte Corticosteron.

2.3.1.2 REGULATION DER GLUCOCORTICOIDSEKRETION

Die Sekretion von Glucocorticoiden (GC) wird durch die Interaktion zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere - der HHN-Achse - hormonal durch verschiedene Peptidhormone reguliert.

Die physiologisch bedeutsamsten Regulatoren, *corticotropin releasing hormon* oder *factor* (CRH/CRF), dessen Ausschüttung einer multihormonalen Kontrolle unterworfen ist, und Arginin-Vasopressin (AVP) werden aus den hypothalamischen Neuronen in das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem freigesetzt. CRF und AVP stimulieren die Sekretion von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen (HVL) in die systemische Blutbahn. ACTH wird als Teil eines Vorläufers, dem Pro-opiomelanocortin (POMC), synthetisiert. Aus POMC gehen durch gewebsspezifische enzymatische posttranslationale Prozessierung multiple Peptide, unter anderem ACTH hervor. ACTH bewirkt in der Nebennierenrinde (NNR) die Ausschüttung von Cortisol und anderen Steroiden (Übersicht in ORTH & KOVACS, 1998).

Die Sekretion von ACTH aus dem Hypothalamus wird durch endogene Pulsgeber stimuliert und folgt so einer pulsatilen und zirkadianen Rhythmik (CLAUS & WEILER, 1996).

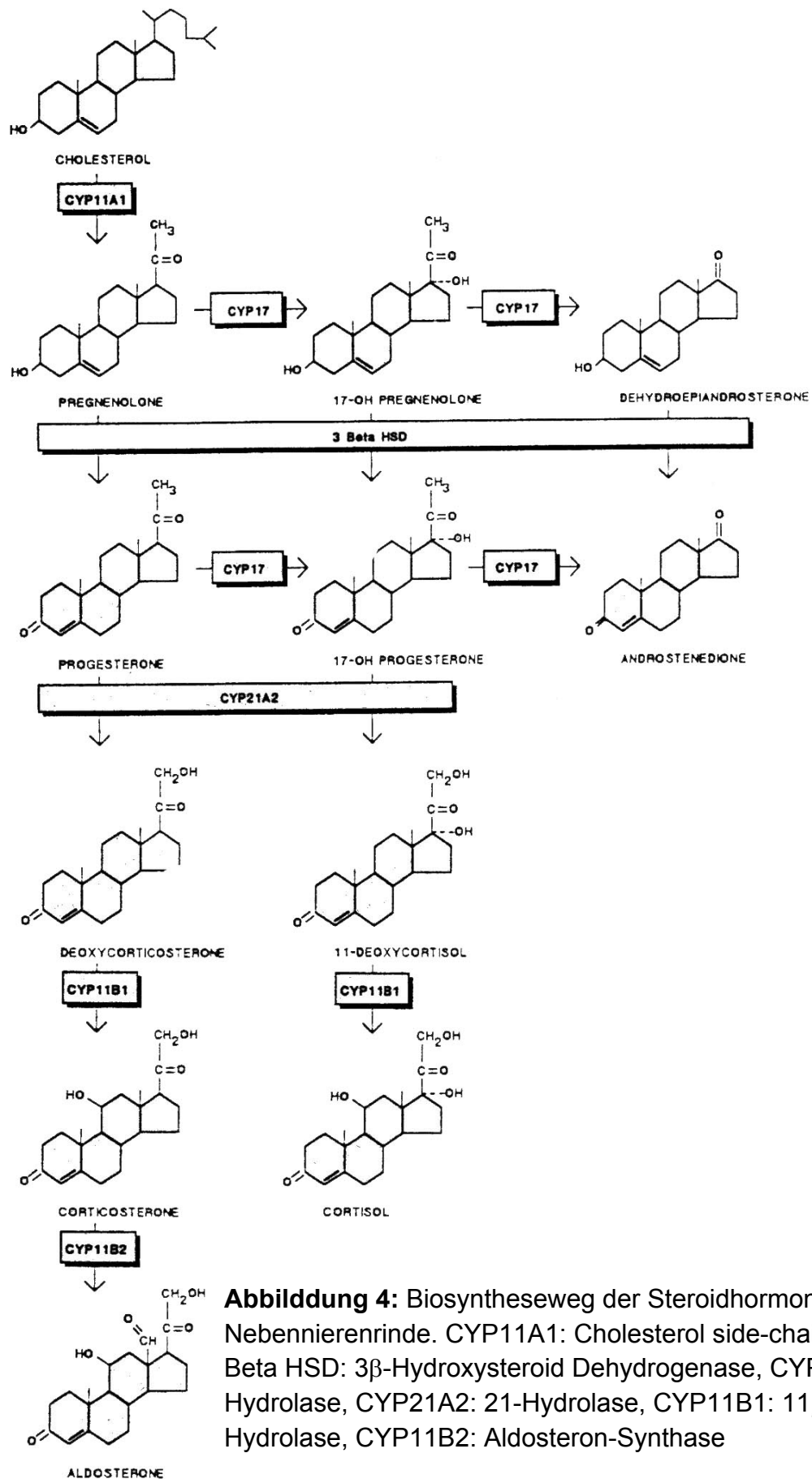


Abbildung 4: Biosyntheseweg der Steroidhormone in der Nebennierenrinde. CYP11A1: Cholesterol side-chain enzym, 3 Beta HSD: 3 β -Hyxysteroid Dehydrogenase, CYP17: 17 α -Hydrolase, CYP21A2: 21-Hydrolase, CYP11B1: 11 β -Hydrolase, CYP11B2: Aldosteron-Synthase

Verschiedene exogene Faktoren wie z.B. chronischer und akuter physischer oder psychischer Stress aktivieren die HHN-Achse und steigern die Konzentrationen an ACTH und Cortisol im Plasma. Zudem besteht zwischen dem Immunsystem und der HHN-Achse ein ausgeprägter Dialog. Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) der Monozyten stimulieren die CRH Freisetzung. Interleukin-2 (IL-2) der T-Lymphozyten und der tumor necrosis factor (TNF), sezerniert von Makrophagen, regen die hypophysäre ACTH Freisetzung teilweise direkt an.

Glucocorticoide weisen einen negativen Rückkopplungsmechanismus (*feed back*) auf. Sie inhibieren sowohl die ACTH Sekretion, als auch die POMC Gentranskription. Dabei wirken sie über die Senkung der Expression von CRH und AVP, die Blockierung der stimulatorischen Effekte von CRF und Inhibierung der CRH-Rezeptor Expression im HVL (DÖCKE, 1996). Die Regulation der Glucocorticoidsekretion und der negative *feed back* Mechanismus sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

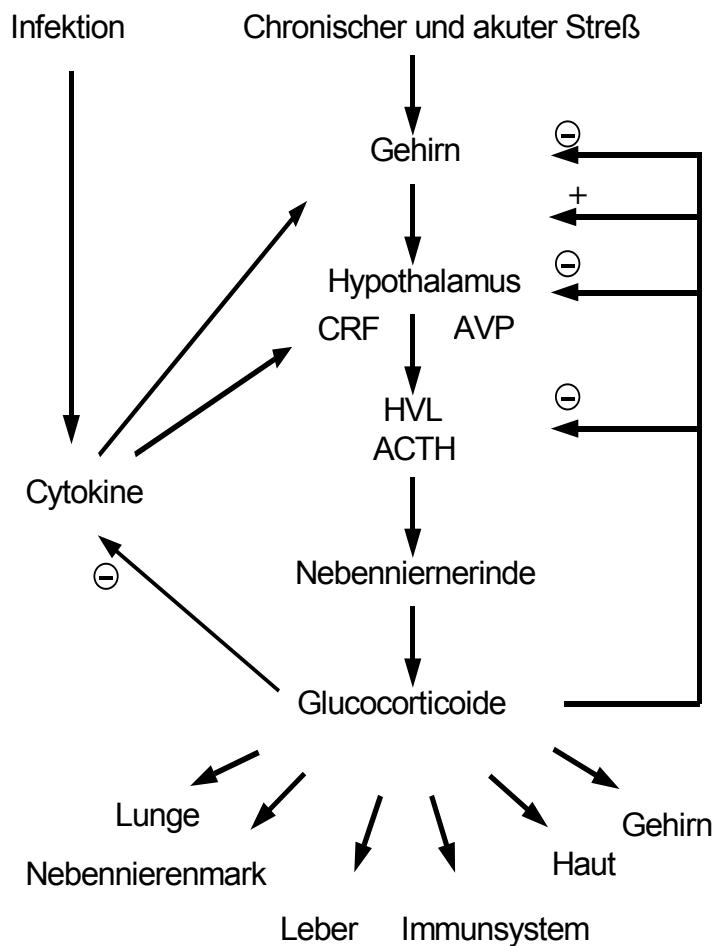


Abbildung 5: Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse

2.3.2 ALLGEMEINE ÜBERSICHT ÜBER DIE REZEPTOR-VERMITTELTE WIRKUNG DER GC

2.3.2.1 AKTIVIERUNG DES GLUCOCORTICOIDREZEPTORS

Glucocorticoide diffundieren aufgrund ihres lipophilen Charakters frei durch die Zellmembran und interagieren mit einem spezifischen intrazellulären Rezeptor, dem Glucocorticoidrezeptor (GCR), welcher phylogenetisch zur hochkonservierten Familie der intrazellulären Hormonrezeptoren gehört. Der Rezeptor befindet sich als Multiproteinkomplex mit verschiedenen *heat shock* Proteinen (HSP 56, 70, 90) in einem Liganden-aktivierbaren Status. Nach Bindung des Hormons wird der HSP-Komplex teilweise abgespalten und der Rezeptor wird aus seiner inaktiven, stillen Form in einen aktiven Transkriptionsfaktor transformiert (CARSON-JURICA, 1990). Auf den Rezeptoraufbau und die Struktur soll in den nachfolgenden Kapiteln noch näher eingegangen werden. In Abbildung 6 ist eine Möglichkeit der komplexen Wirkungsweise von GC dargestellt.

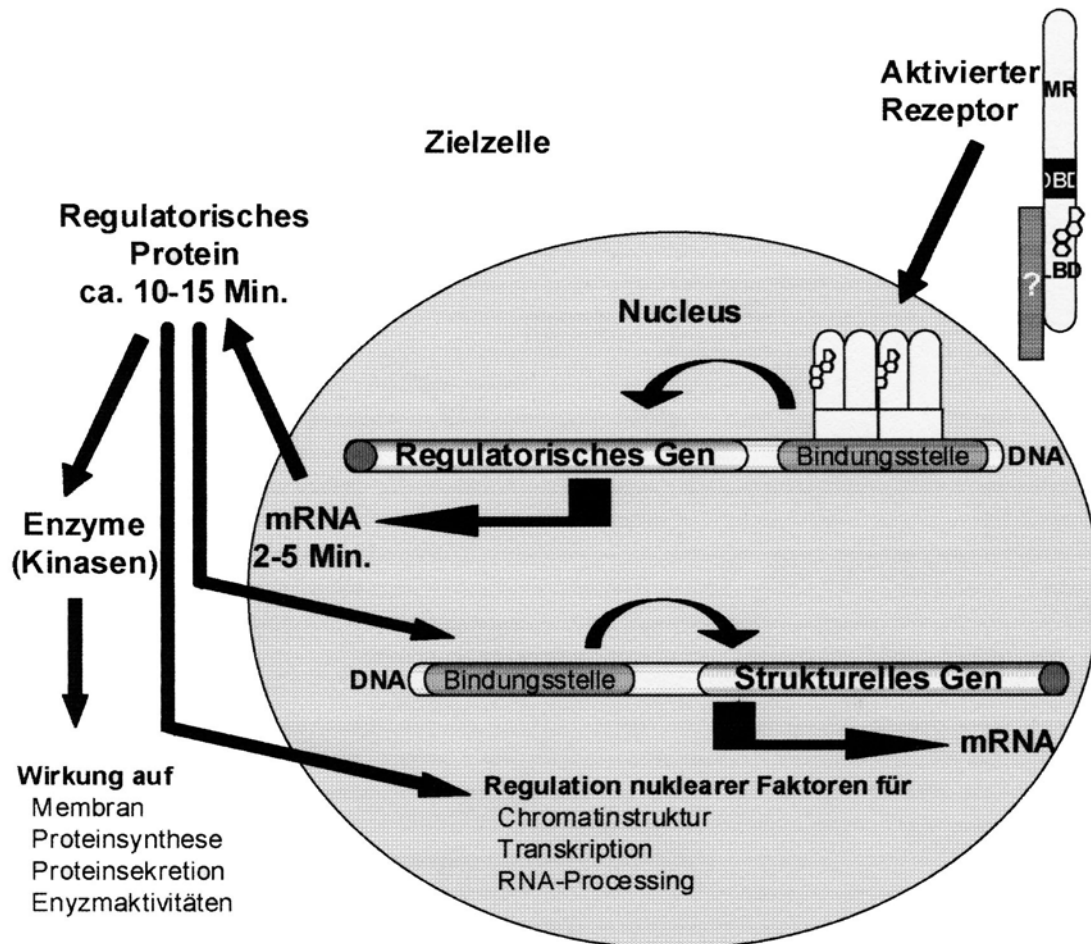


Abbildung 6: Mögliche Wirkungsweise der Glucocorticoide

Im Detail erfolgt die Aktivierung durch folgende Schritte: zuerst findet durch die Hormonbindung eine Konformationsänderung des GCR Moleküls statt. In Konsequenz folgt die Abspaltung des HSP-Komplexes (PRATT, 1992). Währenddessen wird der partiell phosphorylierte Rezeptor hyperphosphoryliert (ORTI et al., 1992; ORTI et al. 1993; BODWELL et al., 1998). Letztendlich werden die *nuclear localisation signals* der Hormonbindungsdomäne demaskiert und bedingen die nukleare Translokation, also die Wanderung des cytoplasmatischen GCR in den Kern (AKNER et al., 1994). Nach der Translokation der cytosolischen Rezeptoren, bewirken diese die Aktivierung (Transaktivierung, siehe Abbildung 8) oder Inhibition (Transrepression, siehe Abbildung 9) von Zielgenen. Die Modulation der Genexpression erfolgt über direkte Bindung des Rezeptors an die DNA oder über Interaktion mit Transkriptionsfaktoren.

2.2.2.4.1 DNA-BINDUNG ÜBER GLUCOCORTICOID RESPONSIVE ELEMENTS (GRE)

Im Nukleus interagiert die DNA-Bindungsdomäne (DBD) des GCR, die aus zwei so genannten Zinkfingern gebildet wird, mit spezifischen DNA Sequenzen: dabei bindet ein Rezeptorhomodimer an kurze DNA Sequenzen mit Palindromcharakter, die als *glucocorticoid-responsive elements* (GRE) bezeichnet werden. In Abbildung 7 ist eine Detaildarstellung der Zinkfinger der DBD und der Bindung des GCR-Homodimers an das GRE schematische aufgezeigt.

Diese GREs befinden sich in der Promotor- und Enhancerregion von GC sensitiven Genen. Das GCR-Homodimer interagiert dann mit verschiedenen Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie, entweder direkt durch physikalische Bindung zwischen den Transaktivierungsdomänen und den basalen Transkriptionsfaktoren wie z.B. TFIIB, oder indirekt über Brückenfaktoren wie z.B. den *steroid receptor coactivator 1* (SCR-1). Diese Interaktion dient der Stabilisierung des Initiationskomplexes mit dem Promoter, wodurch die Transkription durch die RNA Polymerase II Aktivität verbessert wird. Weiterhin kommt es zu einer Umstrukturierung der Chromatinstruktur, wodurch andere Transkriptionsfaktoren an die vorher nicht zugängliche DNA binden können (BEATO et al., 1995, BAMBERGER, 1996; COLLINGWOOD et al., 1999). Die Aktivierung des GCR ist in Abbildung 8 dargestellt.

Das Ausmaß und der Zeitverlauf der GC-Wirkung korrelieren dabei mit der "Qualität" (GRE Sequenz und umgebende Sequenz) und der Quantität der GRE. Eine sehr schnelle Genantwort wird durch eine hohe Anzahl GREs induziert. Dabei werden von diesen Genen die meisten GCR-Komplexe "abgefangen", wodurch diese zuerst durch den GCR aktiviert werden (*immediate early*). Eine weitere hypothetische Genantwort wird als *super induced* bezeichnet. Sie vollzieht sich langsamer aber die Rate der Transkriptionsinduktion ist im Vergleich wesentlich höher. Dies kann durch eine unterschiedliche Qualität der GREs, also einer stärkeren GCR-Bindung, erklärt werden. Zielgene mit einer späten Antwort

werden erst einige Stunden nach der Hormonbehandlung aktiviert. Die Gene enthalten weniger GRE, die weiter *upstream* oder *downstream* von der Promotorregion liegen (MIESFELD, 1990).

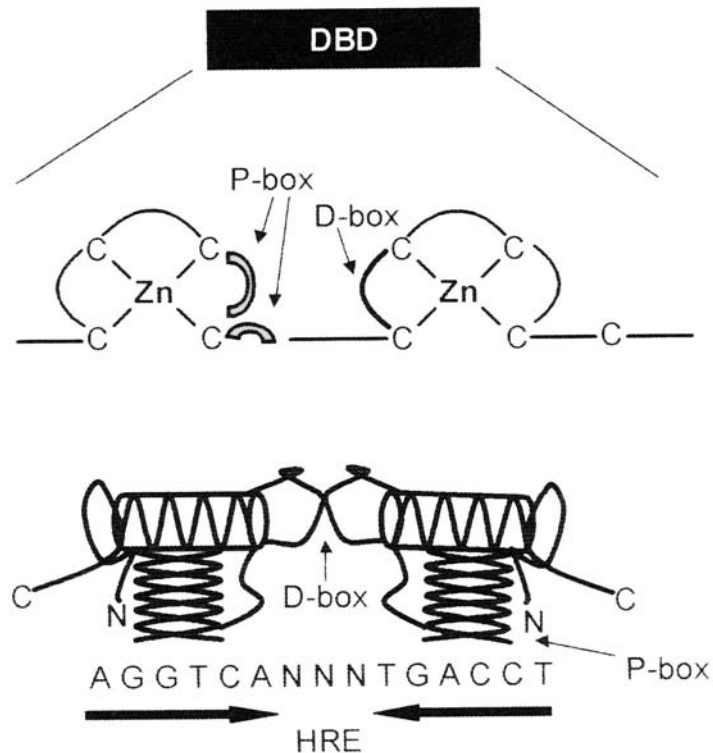


Abbildung 7: Zinkfinger der DNA-Bindungsdomäne
Interaktion der P-Box mit dem GRE und die Beteiligung der D-Box an der
Dimerisierung des GCR nach GLASS (1994)

In einigen Promotorregionen kommen so genannte negative GREs (nGRE) vor, die vielmehr eine Inhibition als eine Verbesserung der Transkription bewirken. Im POMC Promoter wurde beispielsweise ein nGRE festgestellt, das nur leicht einem klassischen GRE ähnelt. Der GCR/nGRE Komplex unterdrückt die Transkription des POMC Gens (ORTH & KOVACS, 1998). Die Repression erfolgt wahrscheinlich durch die Verdrängung eines *enhancer binding protein* (EBP), das in Abwesenheit von GC mit dem nGRE interagiert. Eine entsprechende Funktion wurde für die Regulation der Prolaktin Promoter Aktivität beschrieben (SAKAI et al., 1988). Ein gleichartiger Mechanismus erklärt vielleicht auch die Interleukin-1 Repression (LEE et al., 1988). In Hautzellen wird die Kreatingenexpression durch die Bindung von vier GCR Monomeren an nGREs unterbunden (RADOJA et al. 2000)

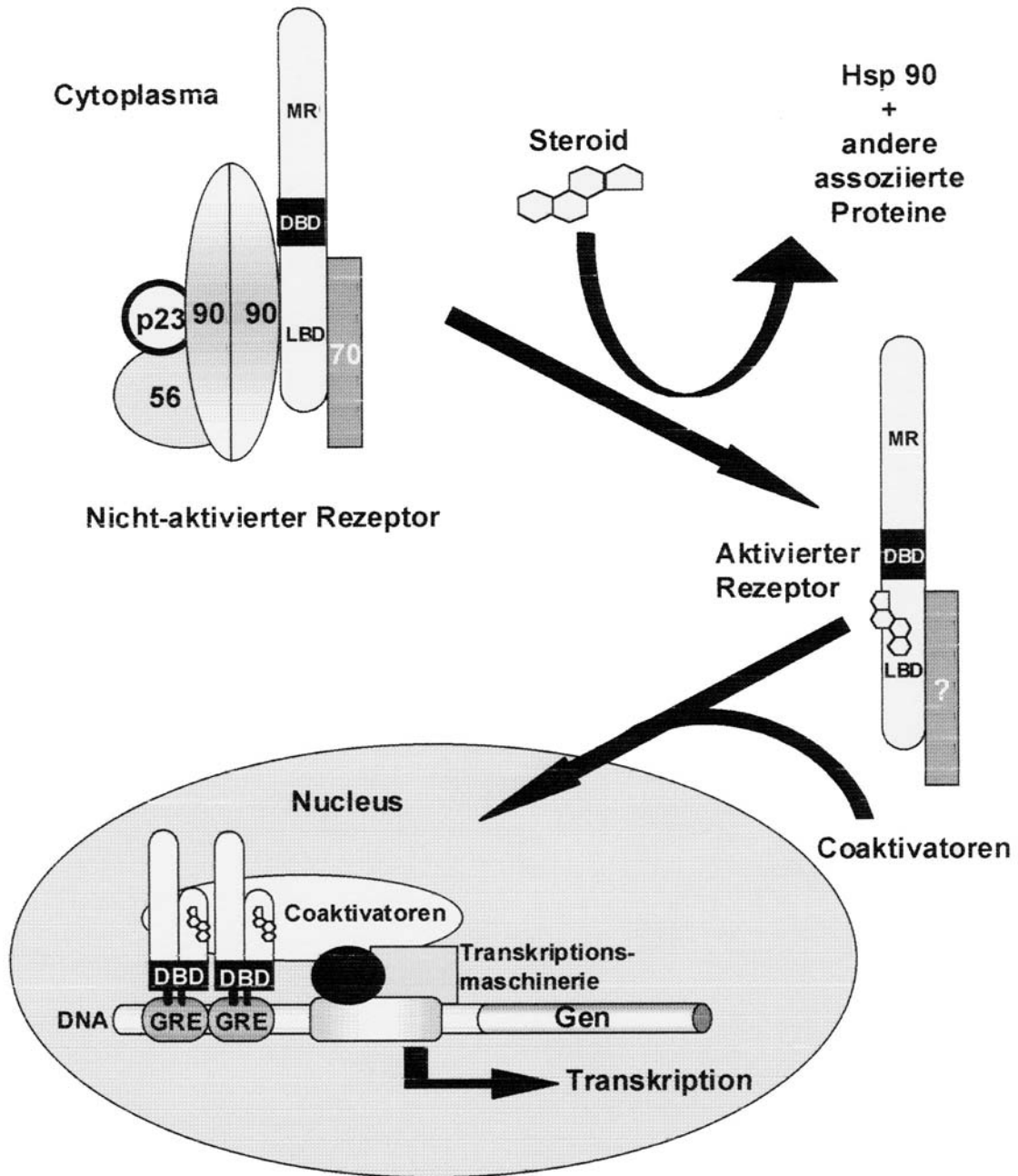


Abbildung 8: Aktivierung der Transkription durch Glucocorticoide
 Der GCR mit seinen Domänen (MR = modulatorische Region, DBD = DNA-Bindungsdomäne, LBD = Ligandenbindungsdomäne) wird durch den *heat shock protein* (HSP)-Komplex (56, 70, 90) in einem Liganden-aktivierbaren Status gehalten. Nach Bindung des Hormons wird der HSP-Komplex teilweise abgespalten und der Rezeptor wandert in den Kern. Als Homodimer bindet er an *glucocorticoid responsive elements* (GRE) und interagiert durch Koaktivatoren mit der Transkriptionsmaschinerie

2.3.2.1.1 PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN

Viele Effekte der GC werden vielmehr durch die Hemmung von Zielgenen erreicht. Dies betrifft vor allem die anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Effekte von GC. Die negative Transkriptionsregulation (Transrepression) von Genen, die für die Immunantwort entscheidend sind, wie z.B. das Collagenase und Interleukin-2 Gen enthalten überraschenderweise keine nGRE oder andere GCR-bindende Sequenzen. Zudem zeigen Studien von TRONCHE et al. (2000), dass trotz einer Punktmutation im *D-loop* des zweiten Zinkfingers, welche die Dimerisierung, damit die Bindung an DNA und in Folge die Transkriptionsaktivität beeinträchtigt, die Lebensfähigkeit homozygoter Mäuse ($GCR_{dim/dim}$) nicht eingeschränkt ist. Daraus ist zu schließen, dass der GCR die Transkription vielmehr über Protein-Protein Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren moduliert.

Beispielhaft ist die Transrepression des *activating protein-1* (AP-1) in Abbildung 9 dargestellt. Dieser Transkriptionsfaktor wird aus Dimeren der Jun und Fos Proteine gebildet und durch Wachstumsfaktoren und Cytokine über mitogen-aktivierte Proteinkinasen stimuliert (BAMBERGER et al., 1996). Der aktivierte GCR inhibiert die für die AP-1 Aktivierung notwendige Phosphorylierung, wodurch die transkriptionelle Aktivität von AP-1 unterdrückt wird (CAELLAS et al., 1997). Eine synergistische Aktivierung der Transkription ist durch die Interaktion des GCR mit jun Homodimeren, C/EBP β oder STAT-5 (*signal transducers and activators of transcription*) Proteinen zu erwarten (Bamberger, 1996).

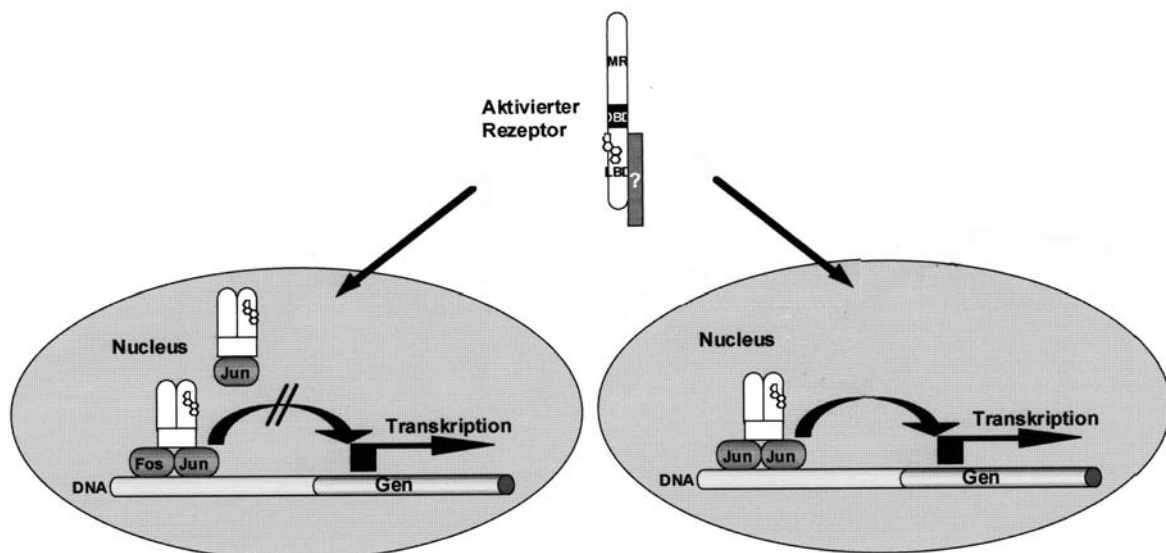


Abbildung 9: Repressive und synergistische Wirkung auf die AP-1 vermittelten Transkription durch den GCR

Ein weiterer Mechanismus ist die Konkurrenz um limitierende Kofaktoren wie CBP (*cyclic AMP response element binding protein*) und p300, beides sind Histonacetyltransferasen (KAMEI et al., 1996; COLLINGWOOD et al., 1999).

Weitere Transkriptionsfaktoren werden z. T. durch direkte und indirekte Interaktion mit dem GCR moduliert, wie z.B. der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der eine entscheidende Rolle in der Induktion der Cytokingenexpression und damit der Immunantwort einnimmt (siehe auch 1.1.1.1). Neben der physikalischen Interaktion mit der p65 Untereinheit des NF- κ B, unterdrückt der aktivierte GCR durch Induktion der Expression eines Inhibitorproteins I κ B, welches NF- κ B einfängt und in einen inaktiven cytoplasmatischen Komplex überführt, die Transkription von Cytokinen (TRONCHE et al., 2000).

2.3.3 DER GCR ALS MITGLIED DER INTRAZELLULÄREN HORMONREZEPTOREN

Glucocorticoide wirken über spezifische intrazelluläre Rezeptoren, wie bereits unter 2.3.2.1 besprochen. In diesem Abschnitt soll auf die strukturellen und funktionellen Besonderheiten des GCR näher eingegangen werden. Dieser Rezeptor gehört phylogenetisch zur hochkonservierten „Superfamilie“ der intrazellulären Hormonrezeptoren. Aus der Analyse des Rezeptoraufbaus und dem Vergleich der einzelnen Rezeptoren erfolgt die Untergliederung in drei verschiedene Subfamilien (Zusammenfassung in EVANS, 1988; CARSON-JURICA, 1990; O'MALLEY, 1990; LAUDET et al. 1992; WILLIAMS & FRANKLYN, 1994).

Der Subfamilie der Typ I Rezeptoren werden die klassischen Steroidhormonrezeptoren, wie der Glucocorticoidrezeptor (GCR), Androgenrezeptor (AR), Mineralocorticoidrezeptor (MR) und der Progesteronrezeptor (PR) zugeordnet. Die Typ II Rezeptoren umfassen Rezeptoren für Thyroidhormone (T₃R), Retinolsäure (RAR), Retinoide (RXR) und Vitamin D (VDR). Weiterhin gehören zu dieser Familie die Orphanrezeptoren, deren Liganden noch nicht identifiziert sind, und der *peroxisome proliferation-activating* Rezeptor (PPAR) (O'MALLEY & CONNEELY, 1992). Der Östrogenrezeptor (ER) kann nicht eindeutig den Typ I oder Typ II Rezeptoren zugeordnet werden und bildet daher zusammen mit den *oestrogen-related receptor* (ERR) Proteinen seine eigene Subgruppe (LAZAR, 1991). In den letzten 20 Jahren wurden bei verschiedenen Spezies nahezu 20 unterschiedliche intrazelluläre Hormonrezeptor cDNAs isoliert und vollständig sequenziert. Tabelle 1 gibt einen Überblick.

Tabelle 1: Isolierte und sequenzierte intrazelluläre Hormonrezeptor cDNAs

Rezeptor des Liganden	Spezies	Referenz
Glucocorticoide	Mensch	HOLLENBERGER et al., 1985
	Ratte	MIESFELD et al., 1986
	Maus	DANIELSON et al., 1986
	Affe	REYNOLDS et al., 1997
	Meerschwein	KEIGHTLEY & FULLER, 1994
Progesteron	Frosch	GAO et al., 1994
	Kaninchen	LOOSFELD et al., 1986
Androgenen	Huhn	JELTSCH et al., 1986
	Mensch	LUBAHN et al., 1988
Mineralocorticoide	Ratte	CHANG et al., 1988a
		CHANG et al., 1988b
	Mensch	ARRIZA et al., 1987
Retinolsäure	Mensch	PETKOVICH et al., 1987
Thyroide	Mensch	WEINBERGER et al., 1986
	Huhn	SAP et al., 1986
Vitamin D	Affe	MCDONNELL et al., 1986
	Ratte	BURMESTER et al., 1988
	Mensch	BAKER et al., 1988
Östrogen	Mensch	GREEN et al., 1986
	Huhn	KRUST et al., 1986
	Ratte	KOLKE et al., 1987
	Frosch	WEILER et al., 1987

Aufgeführt sind nur die vollständig sequenzierten intrazelluläre Hormonrezeptoren

2.3.3.1 AUFBAU DES GCR

Prinzipiell zeigt die aus den cDNAs der Steroidrezeptoren abgeleitete Aminosäuresequenz, dass bestimmte Regionen eine hohe Übereinstimmung aufweisen und somit gleiche strukturelle und funktionelle Eigenschaften besitzen. Alle Mitglieder der Superfamilie der intrazellulären Hormonrezeptoren weisen diese charakteristische und essentielle „Drei-Domänen-Struktur“ auf, wobei die einzelnen Domänen eine unterschiedliche Konservierung aufweisen. Am Beispiel des humanen GCR soll der Aufbau und die Struktur aufgezeigt werden. Die N-terminalen Region des humanen GCR umfasst 420 Aminosäuren und wird als hypervariable, modulatorische, immunogene Region oder Transaktivierungsdomäne bezeichnet. Die zentrale DNA-Bindungsdomäne (DBD) ist reich an Cystein, Lysin und Arginin Resten und ist hoch konserviert. Die Sequenz zwischen der DNA-Bindungs- und der Ligandenbindungsdomäne wird als Hingeregion bezeichnet. Die Aminosäuresequenzübereinstimmung der C-terminalen ligandenbindenden Region spiegelt sich in der strukturellen Verwandtschaft der

Hormone selbst wieder. In Abbildung 10 sind die Übereinstimmungen der einzelnen Domänen nach EVANS (1988) und WILLIAMS & FRANKLYN (1994) zusammengefasst.

Rezeptoren						Homologie		
						A/B	C	D/E/F
				777	GR	100	100	100
				984	MR	>15	94	57
				933	PR	>15	90	55
				918	AR	>15	84	51
				595	ER	>15	52	30
				562	RAR α	>15	45	15
				490	TR α	>15	47	17
					VDR	>15	42	>15

Abbildung 10: „Drei-Domänen-Struktur“ der Steroidrezeptoren und Homologie (links) Modell zum Vergleich der Rezeptorgröße und zur Illustration der konservierten Regionen der Mitglieder der humanen Steroidhormonrezeptor Superfamilie einschließlich des GCR, MR, PR, AR, RAR, TR und VDR nach JENSEN (1991). rechts) Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der N-terminalen modulatorischen Region (A/B), DNA-Bindungsregion (C) und Ligandenbindungsdomäne (D/E/F)

Klonierung, Mutagenese und in vitro Analysen trugen zur Aufklärung dieser Strukturen, ihrer Funktion und damit der Wirkungsweise der verschiedenen Steroidhormonrezeptoren bei. Eine gute Übersicht zum Rezeptoraufbau geben die Artikel von EVANS (1988), LANDERS & SPELSBERG (1992), SIMONS (1994) und BEATO et al. (1995).

2.3.3.1.1 AUFBAU GCR-GENS UND DER GENPRODUKTE

In Abbildung 11 sind das Gen und die Genprodukte des humanen GCR schematisch dargestellt. Durch alternatives *Splicing* der Exons 9 α oder 9 β entstehen zwei Isoformen des Proteins - GCR α und GCR β . Die GCR mRNA umfasst 3557 bp. Daraus resultiert zum einen das GCR α Protein mit 777

Aminosäuren (~98 kDa). Bis zur Aminosäure 727 sind die beiden Isoformen identisch, dann divergieren sie, wobei der hGCR α weiter 50 Aminosäuren und der hGCR β 15 nicht homologe Aminosäuren aufweist. Der hGCR β umfasst somit 742 Aminosäuren (~ 94 kDa). Alternatives *Splicing* führt zum Einbau einer Aminosäure in der DNA-Bindungsdomäne und stellt eine weitere Isoform dar, die von RIVERS et al. (1999) als γ GCR charakterisiert wurde.

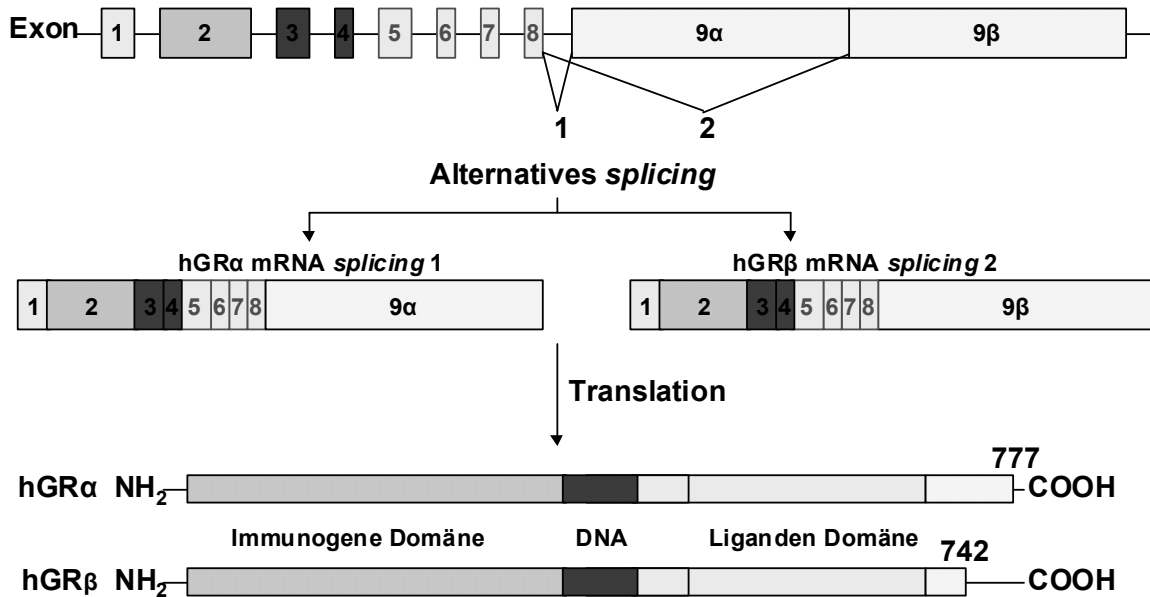


Abbildung 11: Struktur des humanen GCR Gens und dessen Genprodukte durch alternatives *Splicing*. Kästen und Linien repräsentieren Exons bzw. Introns. Aus Exon 1 und 2 resultiert die immunogene Domäne, Exon 3 und 4 kodieren für die DNA-Bindungsdomäne (DNA). Die Ligandenbindungsdomäne wird von den Exons 5,6,7,8, und 9 α , für den GCR α oder 9 β , für den GCR β gebildet Größe und funktionelle Domänen der α und β -Isoform nach VOTTERO & CHROUSOS (1999).

2.3.3.1.2 FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN DER SUBDOMÄNEN

Die N-terminale Domäne enthält Sequenzen, die für die Aktivierung der Zielgene verantwortlich sind und die vermutlich auch mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie und / oder mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren (GIGUERE et al. 1986; HOLLENBERGER et al., 1987). Die entsprechende Region der transkriptionellen Aktivität wird als Transaktivierungsfunktion 1 (TAF-1) oder *activation function* (AF-1) bezeichnet. Von HOLLENBERGER & EVANS (1988) wird diese Aktivität im humanen GCR den Aminosäuren 98 bis 282, von DAHLMAN-WRIGHT et al. (1994) den Aminosäuren 77 bis 262 zugeschrieben und als tau1 definiert. Bei der Ratte wurde eine weitere transkriptionelle Aktivität (enh2) festgestellt (GODOWSKI et al., 1988). Die

modulatorische Region ist somit an der Zelltyp spezifischen Regulation der Gentranskription beteiligt. Ebenso spielt sie in der Rezeptordimer Bildung eine Rolle.

Zwei hochkonservierte „Zinkfinger“ im zentralen Bereich des Rezeptormoleküls bilden die DNA Bindungsdomäne (GIGUERE et al., 1986; FREEDMAN et al., 1988; ZILLIACUS et al., 1995). Mit vier Cysteinresten wird jeweils ein Zinkatom gebunden (LUISI et al., 1991). Drei Aminosäuren 458, 459 und 462 der *P box* (458-462) des humanen GCR sind für die spezifische Bindung der DNA und damit für die biologische Aktivität des Rezeptors entscheidend. Anhand der Sequenz der *P box* können die Steroidrezeptoren den Typ I, II oder Estrogenrezeptoren zugeordnet werden (DANIELSEN et al., 1989). Weiterhin spielt die DNA Bindungsdomäne (DBD) eine wichtige Rolle bei der Rezeptordimerization (TSAI et al., 1988). Eine kurze Sequenz von 477-481, die *D-box/D-loop* ist darin involviert. Am C-terminalen Ende der DBD befindet sich ein *nuclear localization signal* NLS 1; es reicht bis in die Hingeregion hinein und ist an der Wanderung des Rezeptors vom Cytoplasma in den Kern involviert (PICARD & YAMAMOTO, 1987; YLIKOMI et al. 1992; LaCASSE & LEFEVBRE, 1995; TANG et al., 1997). Eine transkriptionelle Aktivität kann der Region enh1 (as 484-492) zugeordnet werden. Die spezifische Bindung an DNA kann durch verschiedene Mutationen verringert werden (DANIELSON et al., 1989).

In der Hingeregion (as 487-527) befindet sich das N-terminale Ende der tau2 Region, ein weiter transkriptionsaktivierender Sequenzabschnitt (GIGUERE et al., 1986; LEFSTIN et al., 1994). Ihr wird ebenso ein gewisse Funktion bei Protein-Protein Interaktionen zu geschrieben.

Die Funktion der C-terminalen oder Hormonbindungsdomäne (LBD) stellt sich wesentlich komplexer dar. Die Bindungsstelle für den Hormonliganden (as 529-777) wurde anhand von Deletionsmutationen und kontrolliertem Proteaseverdau des nativen Rezeptormoleküls spezifiziert (GIGUERE et al. 1986). Jedoch weist keines dieser Fragmente dieselbe Steroidbindungsaffinität auf, wie der intakte Wildtyp-Rezeptor. Durch gerichtete Mutagenese der Aminosäuren Met⁵⁶⁰, Met⁶³⁹, Gln⁶⁴² und Thr⁷³⁹ konnte von LIND et al. (2000) ein spezifischer Einfluß dieser Aminosäuren auf die Steroidbindungsaffinität, -spezifität und steroidabhängige Transaktivierung festgestellt werden. Die Kernsequenz für die Ligandenbindung wird bei der Ratte einem 16 kDa-Protein zugeschrieben, das von den Aminosäuren 573-673 gebildet wird (SIMONS, 1989).

Das heat shock protein 90 (HSP90) wurde als erstes Molekül identifiziert, welches mit allen Steroidrezeptoren assoziiert ist. Wahrscheinlich existieren mehrere HSP90 Interaktionsstellen, jedoch ist die Region as 537-673 für eine stabile Komplexbildung notwendig (DALMAN et al., 1991; HUTCHISON et al., 1991).

Weiterhin wurde ein *nuclear localization signal* (NLS 2), dessen Sequenz noch nicht eindeutig abgegrenzt ist (PICARD & YAMAMOTO, 1987), und eine Dimerisationsdomäne identifiziert werden (DALMAN-WRIGHT et al., 1992). Eine zusätzlich Transaktivierungsaktivität (tau2), die sich vom C-terminalen Ende der Hingeregion bis in die Ligandenbindungsdomäne erstreckt, wurde als Teil der größeren transkriptionellen Aktivierungsdomäne TAF-2 oder AF-2 charakterisiert (HOLLENBERGER & EVANS, 1988; LANZ & RUSCONI, 1994). Die Ligandenbindungsdomäne enthält Sequenzen zur Stilllegung des Rezeptors in Abwesenheit von Hormonen (HOLLENBERGER et al., 1987). In Abbildung 12 sind die funktionellen Domänen und die regulatorischen Regionen veranschaulicht.

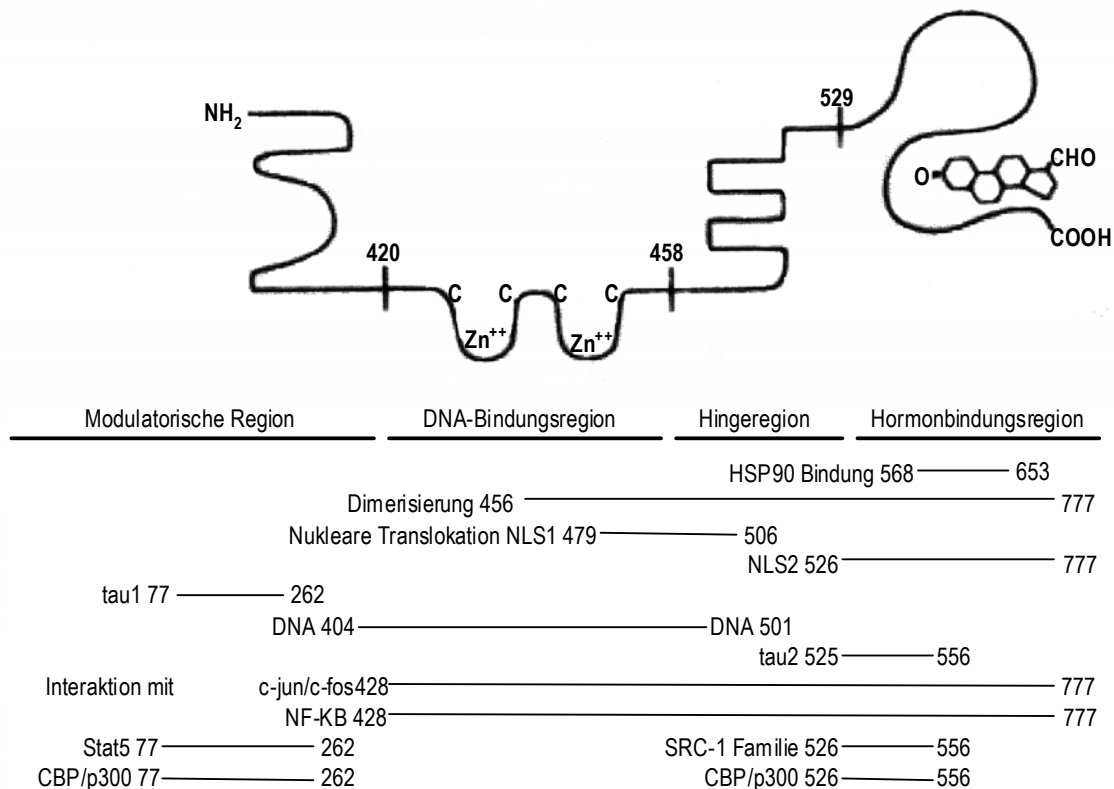


Abbildung 12: Funktionelle Eigenschaften der Subdomänen des GCR
Modifiziert nach LANDERS & SPELSBERG (1992) und VOTTERO & CHROUSOS (1999)

2.3.3.2 QUARTÄRSTRUKTUR UND FALTUNG DES GCR

Frühe Studien zur Rezeptorstruktur zeigten, dass die Rezeptoren in zwei Formen, definiert durch ihr Verhalten bei der Sucrose-Gradientenzentrifugation, aus hormonfreien Zellen isoliert werden konnten. Die kleine 4S Form wurde als Monomer, das mit hoher Affinität an DNA bindet, charakterisiert. Die größere 9S

Form wurde als Multiproteinkomplex definiert (Übersicht in PRATT, 1992; PRATT & TOFT, 1997).

Von BRESNICK et al. (1990) wurde dieser Multiproteinkomplex in der Cytosolfraktion als der untransformierte heteromere GCR beschrieben, dessen Kerneinheit von einem einzelnen Rezeptormolekül und zwei Molekülen eines nicht-steroidbindenden Phosphoproteins, dem *heat shock protein* HSP90, gebildet wird und ein MG von 300 000 aufweist. Der nicht-ligandengebundene Rezeptor ist weiterhin mit einem HSP70 und einem Immunophilin, gekoppelt (HUTCHISON et al, 1993; PRATT, 1993; CZAR et al., 1994). In Abhängigkeit der Stringenz der Extraktionsbedingungen konnten weitere Proteine - hop (60-kDa *hsp organizer protein*), BAG-1 (Bcl-2 assoziiertes Genprodukt 1), p23 (23-kDa Protein), hip - die an der Komplexbildung beteiligt sind, nachgewiesen werden (SMITH & TOFT, 1993). In Abwesenheit von Hormonen durchläuft dieser Komplex einen konstanten Kreislauf der Dissoziation und der ATP- und HSP70-abhängige Reassoziierung.

Dieser Multiproteinkomplex ist hauptsächlich für die Bildung des Heterokomplexes zwischen HSP90 und Proteinen, die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen, verantwortlich (PRATT & DITTMAR, 1998). Grundlegend werden vier Proteine für die GCR-HSP90 Heterokomplexformation benötigt - HSP90, HSP70, p60/hop und HSP40. Dieser Komplex wird jedoch nicht durch eine einfache Gleichgewichtsreaktion gebildet, sondern benötigt die koordinierende Funktion verschiedener Proteine. Abbildung 13 zeigt die Heterokomplexbildung nach DITTMAR et al. (1998). Nach KANELAKIS et al. (1999) ist ein weiteres Faltungsprotein, BAG-1, an der Heterokomplexbildung beteiligt, seine Funktion liegt in der Freisetzung des p60/hop Proteins.

Es besteht eine direkte Beziehung zwischen der Menge an GCR assoziiertem HSP90 und der GC Bindungskapazität (BRESNICK et al., 1989). Studien von NEMOTO et al. (1990) zeigten, dass der Salz-transformierte Rezeptor (durch Inkubation mit 0,4 M NaCl-Lösung) eine etwa 100fach geringere Steroidbindungsaffinität als der nicht transformierte Rezeptor aufweist. Die Hauptfunktion des GCR/HSP Komplexes liegt somit darin, den Rezeptor in einem inaktiven, hochaffinen, liganden-aktivierbaren Status zu halten. Die Bindung des HSP90 maskiert zudem die DNA-Bindungsdomäne und schützt den Rezeptor vor proteolytischem Abbau (siehe Übersichtsartikel PRATT, 1993; HOUSELY et al., 1990).

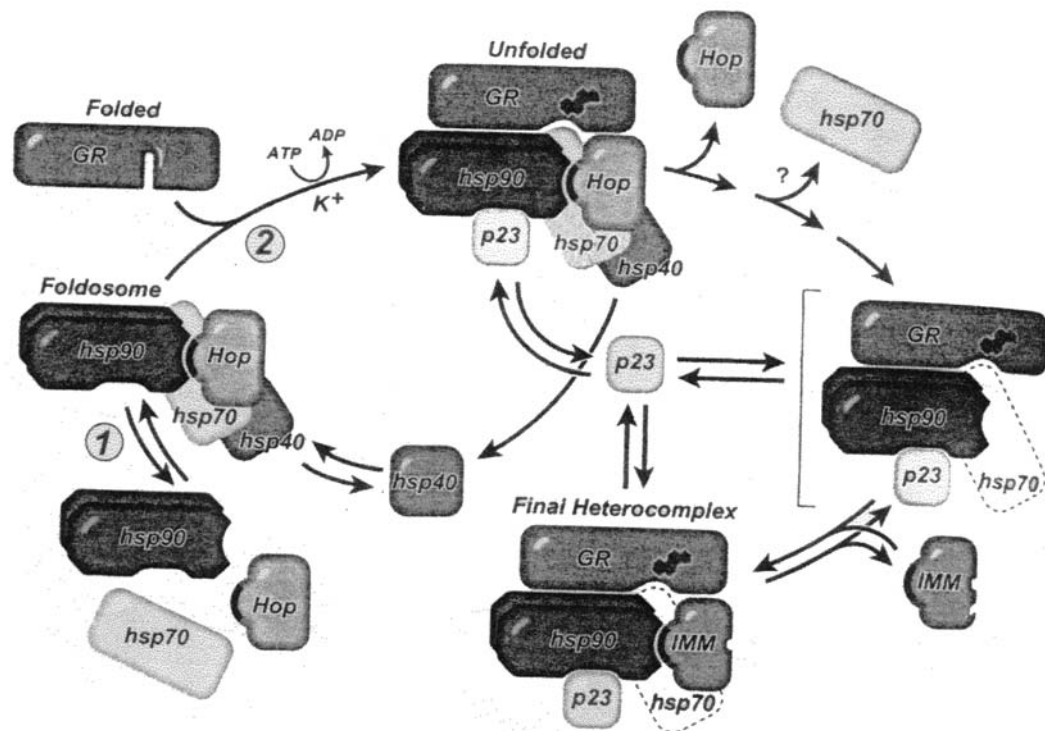


Abbildung 13: GCR-HSP90 Heterokomplexbildung

Hsp90, p60/Hop, HSP70 und HSP40 bilden den Faltungs-Komplex, welcher ATP/Mg²⁺/K-abhängig mit dem gestrippten GCR eine Steroidbindungsstelle bildet. p23 stabilisiert diesen Komplex. Nach der Dissoziation von p60/Hop bindet ein anderes Immunophilin (IMM oder HSP56)

2.3.3.3 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION DES GCR

Die intrazelluläre Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors wird kontrovers diskutiert. Sie variiert in zelltypspezifischer Weise oder innerhalb der selben Zelle in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums, des Differenzierungsgrades und / oder der Phase des Zellzyklus.

In Abwesenheit von Liganden durchläuft der GCR einen konstanten Zyklus der Dissoziation und der ATP- und HSP70-abhängigen Reassoziierung (wie unter 2.1.5.1.5 beschrieben). Entgegen anderer Studien scheint die Bildung des HSP Komplexes den Transport bzw. die Wanderung des GCR durch die Kernmembran nicht ausreichend zu unterbinden. Bei einer Hormonbehandlung wird nach dessen Entzug der im Nukleus befindliche Rezeptor schnell in einen HSP-assoziierten, hormon-sensitiven Komplex recycled, jedoch läuft die Umverteilung des Rezeptors in das Cytoplasma mit $t_{1/2} = 8 - 9$ Stunden sehr langsam ab (HACHE et al., 1999). Die intrazellulären Lokalisation scheint wesentlich dynamischer als zunächst angenommen. Verschiedene Experimente unterstützen das Modell des bidirektionalen Transports des Komplexes zwischen dem Cytoplasma und dem Kern (PRATT, 1993).

BRINK et al. (1992) zeigten in H4-II-E-C3 (*Reuber Hepatoma cell line*), dass der Rezeptor unabhängig vom Hormonstatus im Kern lokalisiert ist und somit das ursprüngliche *Nukleare-Translokations-Modell* (siehe 2.3.2.1) nicht für den GCR gültig ist. Unterstützt wird diese These durch GASC et al. (1989), die nach einer Dexamethasonbehandlung eine Steigerung der Immunfärbung im Kern von Leberzellen der Ratte bei gleichbleibender cytoplasmatischer Immunfärbung beobachten konnten. In der selben Hepatom-Zelllinie wurde von WIKSTRÖM et al. (1987) in beiden Zellkompartimenten der Rezeptor nachgewiesen. Von OZAWA et al. (1999) wurde bei Ratten in nahezu allen GH und ACTH produzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappen und -hinterlappen der immunreaktive GCR vornehmlich im Kern festgestellt. Studien von McGIMSEY et al. (1991) mit polyklonalen Anti-Ratte-GCR-Antikörpern zeigten, dass immunreaktiver GCR im Gehirn, Hypophyse, Leber und Thymus in erster Linie im Kern lokalisiert ist. Wobei eine Adrenalectomy in diesen Untersuchungen zum Abfall der nuklearen und zum Anstieg der cytoplasmatischen Rezeptoren führte.

In GCR transfizierten COS-1 Zellen und HTC Zellen mit endogenem GCR befindet sich der Rezeptor in Abwesenheit von Hormon im Cytoplasma und translokiert nach der Hormonbindung nach 2 Stunden vollständig in den Kern (OAKLEY et al., 1999). Im Cytoplasma und Kern wurden in IM-9 Zellen 2 Stunden nach Dexamethasonapplikation ungefähr gleiche Rezeptorkonzentration gefunden (FLACH et al., 1992). Der Grund für diese Unterschiede ist unklar, kann aber durch Zelltyp spezifische Unterschiede in der Translokations- und / oder der Recyclingrate zurück ins Cytoplasma erklärt werden (OAKLEY et al., 1999). HACHE et al. (1999) postulieren ein dynamisches Gleichgewicht zwischen cytoplasmatischem und nuklearem Rezeptor, also eine kontinuierliche nukleoplasmatische Wanderung des inaktiven GCR, grundlegend ähnlich wie bei ER und PR. In Steroid-resistenten lymphoiden Zelllinien findet kein Transport vom Cytoplasma in den Kern statt (ANTAKLY et al., 1989).

GAMETCHU et al. (1993) und POWELL et al. (1999) wiesen in humanen leukemischen Zellen einen Teil der Rezeptorpopulation in der Plasmamembran nach. In Ratten konnte nach der Applikation von Dexamethason der GCR in Mitochondrien der Leber nachgewiesen werden (Western Blot und elektronenmikroskopische Untersuchungen). Durch in vitro Versuche wurden diese Ergebnisse verifiziert. Es wurde ein temperatur- und hormonabhängiger Transport des GCR in die Mitochondrien beobachtet (DEMONACOS et al., 1993). Zudem befinden sich im Genom der Mitochondrien des Menschen und der Ratte homologe Sequenzen zu den *hormone responsive elements* der Steroidrezeptoren (SEKERIS, 1990).

2.3.4 STEUERUNG DER GLUCOCORTICOIDWIRKUNG UND GEWEBSSPEZIFISCHE GLUCOCORTICOIDSENSITIVITÄT

Die im Blut zirkulierenden GC erreichen alle Organe/Gewebe in gleichem Maße. Verschiedene Zielgewebe und Zellen zeigen jedoch eine unterschiedliche Sensitivität unter normalen physiologischen Bedingungen. Die unterschiedliche GC-Sensitivität von Geweben erfordert daher eine spezifische lokale Feinregulation. Prinzipielle Mechanismen sind: Bioverfügbarkeit des Hormons, Rezeptorkonzentration, Beeinflussung der Rezeptor Interaktionen durch andere Rezeptoren oder gewebsspezifischer Coaktivatoren. Auf die einzelnen Mechanismen soll in den nächsten Kapiteln näher eingegangen werden.

2.3.4.1 BIOVERFÜGBARKEIT DES HORMONS

Cortisol weist eine hohe Affinität zum Mineralocorticoidrezeptor (MCR) auf und liegt in einem hohen Überschuss im Vergleich zu Aldosteron vor (FARMAN & BOCCHI, 2000). In Zielgeweben der Mineralocorticoide wie der Niere und dem Colon spielt daher, um die physiologische Wirkung von Aldosterone zu gewährleisten, die Limitierung an aktivem Cortisol eine entscheidende Rolle. Die 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2 (HSD 2) schützt diese Gewebe vor einem Überschuss durch die Umwandlung in das biologisch inaktive Cortison. Die Aktivierung des MCR erfolgt nur durch Mineralocorticoide und Wasser- und Elektrolythaushalt bleiben im Gleichgewicht (ORTH & KOVACS, 1998; DIEDERICH et al., 2000).

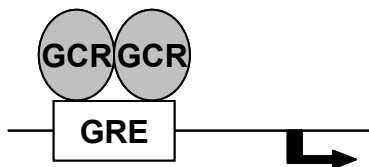
2.3.4.2 GEWEBSSPEZIFISCHE REZEPTORVERTEILUNG

Viele Studien haben gezeigt, dass eine direkte Korrelation zwischen der zellulären GCR Konzentration und der Sensitivität der Zellen gegenüber GC existiert. Bereits VANDERBILT et al. (1987) berichteten, dass die transkriptionelle Antwort direkt proportional zur Anzahl der GCR pro Zelle ist. So erklärt auch die hohe Rezeptordichte im Thymus die hohe Sensitivität dieser Drüse auf endo- oder exogene Glucocorticoidexpositionen (MILLER et al., 1990). Die GCR Expression ist vom physiologischen Zustand abhängig und wird somit durch verschiedene Faktoren, u.a. einem *second messenger* Weg reguliert. Die GC-Sensitivität einer Zelle wird durch ein komplexes aber integriertes hormonales Netzwerk gesteuert (OKRET, 1991). Generell kann der Rezeptor jedoch in einer Vielzahl von Organen und Geweben des Säugetierorganismus nachgewiesen werden (BALLARD et al., 1974; THUN & SCHWARZ-PORSCHKE, 1994; ROUSSEAU & BAXTER, 1979).

2.3.4.3 β -REZEPTOR ISOFORM

Neben dem eindeutig dominant vorliegenden $GCR\alpha$ konnte die Expression der zweiten Isoform, des humanen $GCR\beta$ im Gehirn, der Hirnrinde, Hippocampus, Hypothalamus, Hypophyse, peripheren Leukocyten, Leber, Niere, Lunge, abdominalem Fettgewebe, Skelettmuskulatur, Placenta und in der fetalen Lunge nachgewiesen werden (BAMBERGER et al., 1995; OAKLEY et al., 1996; DeCASTRO et al., 1996; DAHIA et al., 1997). Der $GCR\beta$ bindet kein Hormon und besitzt daher keine transkriptionelle Aktivität. Es wird jedoch berichtet, dass ein Überschuss an $GCR\beta$, zurückzuführen auf eine normale physiologische oder eine pathologische Situation, zur Unterdrückung der Transaktivierung führt (OAKLEY et al., 1999). Ein ungünstiges $GCR\alpha$ zu $GCR\beta$ Verhältnis erklärt die GC Resistenz von Immunzellen (SHAHIDI et al., 1999; HONDA et al., 2000). Die genauen Wirkungsmechanismen sind nicht vollständig geklärt, es wird angenommen, dass der $GCR\beta$ einen fein regulierenden negativen Effekt primär über die GRE Bindung des $GCR\alpha$ ausübt (Abbildung 14). DE-LANGE et al. (1999) bestreiten eine dominante negative Inhibition der GC-Wirkung durch den $GCR\beta$.

Aktivierter $GCR\alpha$



Aktivierter $GCR\alpha$ mit $GCR\beta$

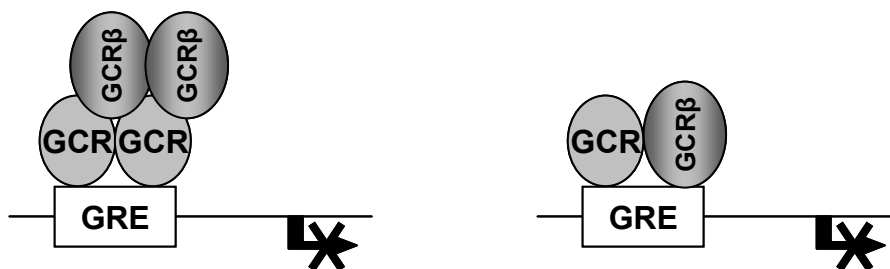


Abbildung 14: Repression des aktivierten $GCR\alpha$ durch $GCR\beta$

2.2.2.5 HETERODIMERIZATION DES GCR MIT ANDEREN STEROIDREZEPTOREN

Ein weiterer Mechanismus zur transkriptionellen Regulation GC-induzierbarer Gene ist die Heterodimerization von Steroidrezeptoren und dem GCR. Trapp et al. (1994) berichten eine wechselseitige Beeinflussung des GCR und MR im Zentralen Nervensystem. In einer Übersicht von Trapp & Holsboer

(1996) wird diskutiert, dass durch Heterodimerbildung der beiden Rezeptoren die Expression von Zielgenen moduliert wird.

2.3.4.4 GEWEBSSPEZIFISCHE COAKTIVATOREN

Bei Untersuchungen von Steroid-resistenten und -sensitiven Patienten mit ulcerativer Dickdarmentzündung, konnte bei resistenten speziell eine NF- κ B Färbung in den Epithelzellen festgestellt werden. In GC sensitiven Patienten wurde NF- κ B hauptsächlich in Makrophagen der Lamina propria nachgewiesen. Die gesteigerte epitheliale NF- κ B Aktivierung ist evtl. für die Insensitivität gegen Glucocorticoide verantwortlich. Ein Überschuß an aktivem NF- κ B verhindert die DNA-Bindung des GCR α . Dies bedeutet, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors stellt einen weiteren Mechanismus zur Regulation der GC-Wirkung dar (BANTEL et al., 2000). NF- κ B und GR können gegenseitig ihre transkriptionelle Aktivität unterdrücken.

2.4 SPEZIELLE BEDEUTUNG DER GLUCOCORTICOIDE IM INTESTINALTRAKT

Der Intestinaltrakt stellt ein enorm adaptives Gewebe dar, das sich in seiner Funktion ständig an neue Anforderungen anpassen muss. Der Darm ist eines der am stärksten beanspruchten Organe, sowohl was die Anpassung an veränderte Nahrungsverhältnisse, als auch die ständige Belastung mit einer Vielzahl an Antigenen anbelangt. Um die Aufrechterhaltung der Funktion zu garantieren sind wirksame Regulationsmechanismen zur Steuerung des Mitose-Apoptose-Gleichgewichts hier von großer Bedeutung.

2.4.1 FUNKTIONEN DES DARMS

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) hat zwei wesentliche Aufgaben zu erfüllen. Seine primäre Funktion liegt in der Verdauung von Nahrungsbestandteilen und der Absorption von resultierenden Nährstoffmolekülen. Die funktionell damit erforderliche hohe Oberfläche, stellt die größte Einzeloberfläche des gesamten Körpers dar. Sie wird ständig mit einer Vielzahl an pathogenen Mikroorganismen und antigenen Substanzen konfrontiert. Eine wirksame Barriere wird einerseits durch die mechanische Integrität der Darmmucosa und andererseits durch das mächtige darmständige Immunsystem gewährleistet.

2.2.2.6 VERDAUUNGSPHYSIOLOGISCHE AUFGABEN

Die speziell für den Dünndarm typische große innere Oberfläche wird durch die Auffaltung auf drei Ebenen erreicht. Die Kerckringschen Falten werden durch Aufwerfungen der Submucosa gebildet. Eine weitere Oberflächenvergrößerung wird durch die finger- bis blattförmigen Ausstülpungen der Lamina propria erzielt. Sie werden auch als Villi intestinales oder Zotten bezeichnet. Diese werden von einer einzelligen Schicht an Epithelzellen bedeckt. Das intestinale Epithel besteht hauptsächlich aus Saumzellen, schleimbildenden Drüsenzellen (Becherzellen), entero-endokrinen Zellen und Panethschen Zellen. Die Saumzellen sind der vorherrschende Zelltyp und werden im Dünndarm als Enterozyten, im Dickdarm als Colonozyten bezeichnet. Dabei handelt es sich um polarisierte Zellen mit einem basalen Nukleus und einem apikalen Bürstensaum, welcher eine weitere Vergrößerung der Oberfläche darstellt. Ihre zentrale Aufgabe liegt in der Sekretion von Verdauungsenzymen und der Absorption von Nährstoffen, die häufig über geregelte Transporter erfolgt (WRIGHT, 1997). Die Aufgabe der Becherzellen liegt in der Sekretion von alkalischem, *epidermal growth factor* (EGF)-haltigem Schleim, der das Epithel vor aggressiven Substanzen schützt und aufgrund der mitogenen Eigenschaften von EGF bei Läsionen die Regeneration des Epithels sofort durch Stammzellmitosen einleitet (CLAUS et al., 2001). Panethschen Zellen produzieren Lysozym. Entero-endokrine Zellen sezernieren eine Vielzahl an

Hormonen und Peptiden, einschließlich Serotonin, Enteroglucoagon, Somatostatin, Sekretin, Gastrin, Motilin und Vasointestinales Peptid (VIP) . Im Vergleich zum Dünndarm befinden sich im Dickdarm wesentlich mehr schleimbildende Becherzellen. Die Abgrenzung gegen das Darmlumen wird durch *tight junctions* zwischen den Epithelzellen und gegen die Lamina propria durch die Basalmembran realisiert .

Die Lamina propria befindet sich im Mittelstück der Zotten. Sie ist aus Kollagen Reticulin, Fasern, Fibroblasten und einer Glykosaminoglycanmatrix zusammengesetzt. Sie ist mit Blutgefäßen, Nervenfasern, glatten Muskelfasern und Lymphgefäßen durchzogen und enthält weiterhin Lymphocyten, Plasmazellen, Makrophagen, Mastzellen und eosinophile Zellen.

2.2.2.7 IMMUNOLOGISCHE FUNKTION DES DARMS

Neben der mechanischen Barriere sind andere Abwehrmechanismen erforderlich. Das Risiko der Einwanderung von Mikroorganismen in die subepithelialen lymphatischen Bereiche ist z.B. im Fall von Unterernährung und einer dadurch hervorgerufenen Auflösung der *tight junctions* (undichtes Epithel) stark erhöht. Hier greift das *gut-associated-lymphoid-tissue*, das auch kurz als GALT bezeichnet wird. Es setzt sich aus Immunzellen des Epithels und der Lamina propria zusammen.

Im Zottenepithel befindliche Lymphozyten werden als intraepitheliale Lymphozyten bezeichnet (IEL). Sie befinden sich normalerweise in einer basalen Position zwischen den lateralen interzellulären Räumen. Es handelt sich vorwiegend um T-Lymphozyten. Lymphozyten aus der Lamina propria passieren häufig die Basalmembran und wandern in die Epithelschicht der Zotten ein (FERGUSON & MURRAY, 1971).

Beim Schwein wurde weiterhin in der Lamina propria mit Hilfe von CD Markern eine große Anzahl der Zellen als Monocyten und Granulocyten identifiziert. Makrophagen sind hauptsächlich im oberen Teil der Zotten lokalisiert, während Mastzellen vorwiegend basal zu finden sind. M-Zellen (*microfold*) sind oberhalb der Peyerschen Platten lokalisiert. Sie nehmen potentielle Antigene und Immunkomplexe auf und leiten sie an Antigen präsentierende Zellen und regulatorische T-Zellen, die in der Kuppelregion des Lymphfollikels lokalisiert sind, weiter.

2.4.2 KOMPARTIMENTIERUNG DES DARMS

Die hohe mechanische und funktionelle Beanspruchung des Darms und die damit verbundenen immensen Zellverluste müssen kompensiert werden. Jedoch haben die hochspezialisierten Darmzellen ihre Teilungsfähigkeit verloren. Der Darm greift daher auf das pluripotente Stammzellprinzip zurück, hierbei gehen aus einer Stammzelle verschiedene Zelltypen hervor. Als Besonderheit kann im Intestinaltrakt eine strikte lokale Trennung der Orte der Zellteilung, -differenzierung und des Zelltods beobachtet werden. Im nachfolgenden Abschnitt soll auf die Kompartimentierung näher eingegangen werden.

Die Stammzellen sind auf die Lieberkühnschen Krypten begrenzt. Dies sind 200 – 500 µm tiefe, tubulöse Einstülpungen an der Zottenbasis. Pro Krypte werden 0,4 bis 60 % aller Kryptenzellen als Stammzellen geschätzt (BOOTH & POTTEN, 2000). Sie liefern dem proliferativen Kompartiment Vorläuferzellen, die sich schnell und asymmetrisch teilen. Die Tochterzellen wandern entlang der Krypte, wobei sie nochmals mehrere Teilungen durchlaufen. Nach Beendigung des Zellzyklus beginnen sie auf dem Weg an die Zottenspitze bzw. an die Oberfläche mit der Differenzierung und nehmen ihre Funktion auf. Dort angelangt werden die apoptotischen Zellen abgestoßen. Die Dünn- und Dickdarmschleimhaut weist somit eine strenge Kompartimentierung auf (Abbildung 15), d.h. die Orte der Zellteilung, Differenzierung und der Apoptose sind von einander getrennt (POTTEN et al., 1997; WRIGHT, 1997).

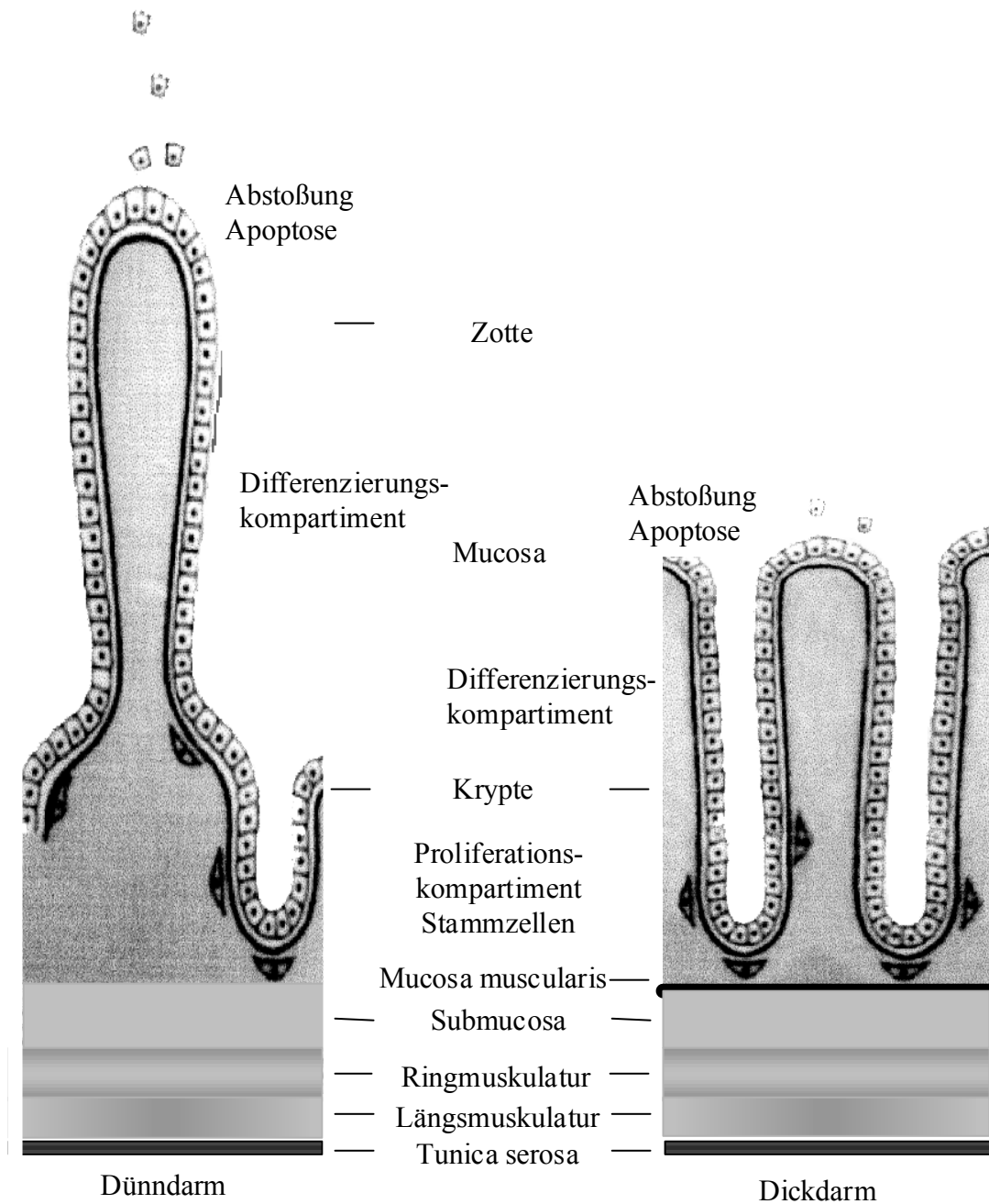


Abbildung 15: Aufbau des Rumpfdarmes mit Kompartimentierung
 Kompartimente der Proliferation, Differenzierung und Apoptose im Dünndarm und
 Dickdarm (modifiziert nach Claus, 1994)

2.4.3 BEDEUTUNG DER GC IM RAHMEN DER REGULATION DES ZELLTURNOVERS IM DARM

Die Mitose wird vornehmlich durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie IGF-I, IGF-II, EGF, FGF und TGF α reguliert (PIMENTEL, 1994). Die Sekretion dieser Wachstumsfaktoren und damit die Zellteilung wird u.a. auch durch nutritive Faktoren direkt beeinflusst. Die Regulation der Differenzierung ist ein Komplexes Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und GC. SCHAEFFER et al. (2000) untersuchten die Expression von Cytokinen im Dünndarm der Ratte während der postnatalen Entwicklung und deren Regulation durch GC. Während der Reifung des Intestinums in der dritten Lebenswoche fiel die Expression von *transforming growth factor* (TGF)- β 1 und - β 2 und IL-1 β ab, TNF- α stieg an und TGF- α blieb konstant. Die Applikation von Cortisol führt zu einer verringerten Expression von IL-1 β (das IL-1 β Gen weist ein negativ regulierendes GRE auf) und den beiden TGF- β Isoformen. Diese Studie macht die Bedeutung der GC in der Entwicklung und Reifung des Intestinaltraktes deutlich. Auch in der Regulation des Apoptosegeschehens kommt den GC eine bedeutende Rolle zu. IWANAGA et al., (1994), IWANAGA (1995) und OHNO et al. (1993) zeigten, dass die Expression von zytotoxischen Substanzen wie z.B. dem *tumor necrosis factor* (TNF)- α in Makrophagen der Lamina propria durch GC stimuliert werden kann

Es gibt also einige detaillierte Studien, die Hinweise auf die zentrale Bedeutung der GC in der Regulation des Zellturnovers im Darm haben. Darauf weisen nicht zuletzt Untersuchungen hin, bei denen die GCR-Konzentrationen in verschiedenen Geweben mit der FPS, als Marker für die pro Tag umgesetzte Proteinmenge eines Gewebes, zusammen gestellt wurden.

Tabelle 2: Vergleich der Erneuerungsrate und der GCR-Konzentration in verschiedenen Geweben

Gewebe	Erneuerungsrate % (Tag 1)	Cortisolrezeptor (fmol/mg)
Weißer Muskel	3,5	9,1
Roter Muskel	4,4	12,4
Dünndarm (Jejunum)	44,0	76,5

Die Tabelle zeigt, dass die GCR-Konzentrationen in außerordentlich enger Übereinstimmung mit der Erneuerungsrate stehen, wobei sogar zwischen verschiedenen Muskeltypen (weißer Muskel durch verlangsamten Proteinabbau stärker hypertrophiert im Vergleich zu rotem Muskel) Unterschiede in der GCR-Konzentration aufzuweisen sind. Damit wird die zentrale Bedeutung der GC unterstützt. Allerdings lassen derartige Untersuchungen keinerlei Aussagen zu, welche Kompartimente bzw. welche Zelltypen jeweils den GCR exprimieren.

Solche Darstellungen bedürfen insbesondere der immunhistochemischen Analyse basierend auf Antiseren, die gegen den schweinespezifischen Rezeptor gerichtet sind. Für diese Spezies stehen jedoch bislang keine Antikörper zur Verfügung. Auch ist die Nukleinsäure- bzw. Proteinsequenz nur fragmentär bekannt.

3 ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN

Der Nachweis freier cytoplasmatischer Rezeptoren kann durch Bindungsstudien mit markierten Liganden aus Zellhomogenaten erfolgen. Bei komplexen Gewebsstrukturen ist jedoch eine nähere Charakterisierung der Glucocorticoidrezeptor-tragenden Zellen sinnvoll. Hierbei erweist sich als Methode der Wahl der Nachweis mit spezifischen Antikörpern.

Neben der molekulargenetischen Klassifikation des schweinespezifischen GCR stand daher die Erzeugung eines spezifischen gegen den Rezeptor gerichteten Antiserums im Vordergrund. Die Vorgehensweise umfasst dabei die Klärung der Nukleotidsequenz und damit der Primärstruktur des Rezeptors. Daraus kann ein entsprechendes Proteinfsegment, das als Antigen geeignet ist, ausgewählt und rekombinant durch einen Expressionsvektor hergestellt werden.

Anwendung fand das polyklonale Antiserum in Untersuchungen zur GCR-Verteilung im Intestinaltrakt. Neben dem Thymus und der Leber weist auch der Gastrointestinaltrakt hohe Konzentrationen an GCR auf. Dies steht im Einklang mit den entsprechenden fraktionellen Proteinsyntheseraten dieser Organe und verdeutlicht die GC-Sensitivität dieser Gewebe (BAXTER, 1971; GARLICK et al. 1979; CLAUS et al., 1996). Das intestinale Epithel bietet zudem ein ideales Modell, zur Untersuchung des Einflusses von Glucocorticoiden auf die Mitose, Differenzierung und Apoptose, da es eine polarisierte topographische Organisation aufweist, d.h. die Orte der Zellteilung, -differenzierung und Apoptose liegen in verschiedenen Kompartimenten der Darmschleimhaut. So kann das Entwicklungsstadium der Zelle anhand ihrer Position innerhalb des Gewebes abgeschätzt werden kann (POTTEN et al., 1997).

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 GERÄTE

Geräte	Hersteller
Bilddokumentations-Systeme	Eagle Eye II, Stratagene, USA Bioprint, LTF, Deutschland
DNA-Sequenzierer	DNA-Sequencer 377, ABI prism™, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Inkubatoren	B-6060, Heraeus, Deutschland Kolbenschüttler Incubator Shaker innova 4080, New Brunswick Scientific, UK
Konzentratoren	Aluminiumblock, Grant, UK
Mikrowellengeräte	SpeedVac 5301, Eppendorf, Deutschland
Eismaschinen	Radarange, Amana
Elektroblotter	AF-10, Scotsman, Italien
Elektrophorese Netzgeräte	TE 70 Semiphor, Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Elektrophoresekammer	PowerPac300, Bio-Rad Laboratories GmbH, Austria PS 500X, Hoefer Scientific Instruments, CA, USA Horizon 58 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland Mighty Small II SE 250, Hoefer Scientific Instruments, CA, USA
Gefrierschränke	Ultrafreezer, Jouan, Frankreich
Gießkammer	Mighty Small Multiple Gel Caster SE200, Hoefer Scientific Instruments, CA, USA
Mikroskop	DMRBE, Leica Instruments GmbH, Deutschland
Microtom	SM2000R, Leica Instruments GmbH, Deutschland
PCR-Geräte	DNA Thermocycler Gene Amp 2400, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland RoboCycler® Gradient 96, Stratagene, USA
PH-Meter	Microprocessor pH Meter, pH 537, WTW, Deutschland
Photometer	Spectrophotometer NovaSpec II, Pharmacia Biotech, Sweden Power WaveX Select, Bio-Tek Instruments Inc., USA
Pipetten	Eppendorf, Deutschland Gilson, UK
Reinstwasseranlagen	Milli-RX20, MILLI Qplus, PF Millipore Corporation, USA USF, ELGA, Purelab Plus
Rührer, Schüttler, Vortexer	IKAMAG® Reo Magnetrührer, IKA-Labortechnik, Deutschland MR 82 Magnetrührer und Polymax 1040, Heidolph, Deutschland Vortex Genie 2™, Bender & Hobein, Schweiz
Software	RNA/DNA Calculator Gene quant II, Pharmacia Biotech, Schweden 7700 Sequence Detector Perkin Elmer, ABI prism™ Bio 1D, LTF, Deutschland

Geräte	Hersteller
Sterilisatoren	Varioklav® Typ 500E Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH, Deutschland
β-Zähler	LS 1801, Beckman Instruments Inc., USA
Thermomixer	Eppendorf, Deutschland
Trockenofen	UT 6060, Heraeus Instruments, USA
UV-Crosslinker	UV Stratalinker® 2400, Stratagene, USA
Waagen	Satorius 1475
Wärmeschränke	T20, Memmert, Deutschland
Wasserbäder	Constant Temperature Circulating Waterbath RCB 300, Hoefer Scientific Instruments, CA, USA Y22, Grant Water-Jacketed Inkubator 3250, Forma Scientific Inc., USA
Werkbänke	LaminAir HB 2472, 2448, Holten, Dänemark
Western blot Inkubator	PR 150 Deca-Probe Incubation Manifold, Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Zentrifugen	L-60 Ultrazentrifuge, Beckman Instruments Inc., USA J6-MI, Beckman Instruments Inc., USA 5410, Eppendorf, Deutschland 5415 C, Eppendorf, Deutschland 5417 R, Eppendorf, Deutschland SpeedVac, Eppendorf, Deutschland Z323K, Hermle Labortechnik, Deutschland

4.2 CHEMIKALIEN, ENZYME, REAKTIONSKITS UND ANTIKÖRPER

Hersteller	Chemikalien
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D	Oligo(desoxythymidin) ₁₂₋₁₈ Primer (27-7858-02) Protein A Sepharose CL-4B (17-0780-01) ECL protein molecular weight marker (RPN 2107) ECL in vitro translation – streptavidin-HRP and blocking reagent (RPN 2195)
Bachem Feinchem, Bubendorf, CH	IGF-1 (H55555)
Baker J.T. , Deventer, NL	Bromphenolblau Natriumsalz (D294) Natriumdodecylsulphat (4095) Natriumchlorid (4058)
Boehringer Mannheim, D	RNase A (0109169) Taq DNA Polymerase (5U/μL) Complete Mini, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (1836153)
Dako, Glostrup, DK	Sheep anti rabbit IgG: Biotin (2ABO2B) StrptABComplex/HRP (K 3077)
Difco	Medium: Luria Broth Base
Fluka Chemie AG ,	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (32750) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Imidazol (56749)
GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland	1 Kb Plus DNA Ladder™ (10787-026) 30% Acrylamide/Bis Solution (10325-017) Agarose (15510-027) Ampicillin, Natriumsalz (11593-019) BamH I (15201-023)

Hersteller	Chemikalien
Loba Feinchemie, A Merck, D	BenchMark™ Prestained Protein Ladder (10748-010)
	Ethidiumbromid (15585-011)
	Hind III (15207-012)
	Primer (GR6, GR7, GR8, GR9)
	React3 Buffer (16303-018)
	T4 DNA Ligase (15224-017)
	T4 DNA Ligase buffer (46300-018)
	T4 DNA Polymerase (1805-017)
	TRizol® Reagent (15596-018)
	Ethanol 99-100 % p.a
	Ammoniumsulfat (1.01217.1000)
	Citronensäuremonohydrat (1.00244.0500)
	Dinatriumhydrogenphosphat (6580)
	Eosinlösung (1345)
	Hämalaun-Lösung (1.09249.2500)
	Morpholinopropanesulfonsäure (MOPS, 1.06129.0250)
	Natriumchlorid (1.6404.1000)
	Natriumdihydrogenphosphat * H ₂ O (1.6346.1000)
	Natriumhydroxid (1.06495.1000)
	Polyethylenglycoll 6000 (PEG ₆₀₀₀ , 8.17007.1000)
	Salzsäure (1.00455.1000)
	Tris ultrapure (1.08382.0500)
	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
dATP (R0141)	
pBR322/Mval ()	
Perkin Elemer, Weiterstadt , D	ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit
	M-MLV-Reverse Transcriptase (M1701)
Promega, Mannheim, D	Recombinat RNAin® Ribonuclease Inhibitor (N2511)
Roth GmbH, Karlsruhe, D	pGEM™ Teasy System II (A1380)
	Aceton (9372.1)
	Chloroform (6340.1)
	Ethanol (9065.1)
	Ethidiumbromid ()
	Essigsäure (3738.1)
	Glycerol (4043.1)
	Glycin (3908.1)
	Isopropanol (6752.1)
	Methanol (4627.2)
	Wasserstoffperoxis (8070.2)
	Zellutrans Dialysiermembran T2 (E660.1)
	Dialysiermembran Typ 27/32 (1784.1)
	Diethylpyrocarbonat (DEPC, D 5758)
	Insulin from porcine pancreas (I-5523)
	Kaliumchlorid (P-3991)
	Magnesiumchlorid (M 2670)
Mineralöl (M 5904)	
Natriumhydroxyd (S-8045)	
Thimerosla (T-5125)	
Tris TRIZMA® Base (T 6066)	
Talent , Trieste, I	Cleanmix DNA Purification Kit (TA050CLN)
	Genomix Cells and Tissues (TA060C&T)
VBC Genomics, Wien, A	Primer (ACT3, ACT4, GR1, GR2, GR3, GR4, GR5)

4.3 BAKTERIENSTÄMME, PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme sind K12-Derivate. Genetische Merkmale und Herkunft dieser Stämme sind in Tabelle 3 zusammengefasst, die Abkürzungen für die Geno- und Phänotypen entsprechen der Nomenklatur von BACHMANN (1990). Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Abbildung 16 und 17, die verwendeten Oligonukleotide in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

E. coli -Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tec^r)]</i>	BULLOK et al. (1987)
BL21 (DE3) pLysS	<i>F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3) pLysS ChloramphR hsdS gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	STUDIER & MOFFATT (1986)

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide für die Gensynthese und der Klonierung

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
ACT3 ¹	tacgcctctggccgcaccac	Gensynthese
ACT4 ²	ccgtacctcaggacgccgta	Gensynthese
GR1 ³	<u>cgggatcc</u> gtttctgcgtcttcaccctc	Gensynthese – <u>BamHI</u>
GR2 ⁴	aatgtctggaagcaatagttaagg	Gensynthese
GR3 ⁵	ttggcaggagaggagg	Sequenzierung
GR4 ⁶	ctgcatacaacacctcg	Sequenzierung
GR5 ⁷	<u>cccaagcttggg</u> ttagccagtctgacccttcacat	Gensynthese – <u>HindIII</u> - Stop
GR6 ⁸	cctgactgtggaagctg	Sequenzierung
GR7 ⁹	ttcaggaacttacacctgg	Sequenzierung
GR8 ¹⁰	agaggtttctgctcctgc	Sequenzierung
GR9 ¹¹	gtctctttacctggagacc	Sequenzierung
T7	taatacgavtcaactataggg	Sequenzierung
SP6	attaggtgacactatag	Sequenzierung
M13rev.	AGGAAACAGCTATGACCAT	Sequenzierung

¹ GenBank Accession No.: U16368 nt 3305 - 3324

² GenBank Accession No.: U16368 nt 3987 - 4006

³ GenBank Accession No.: U37385 nt 1 - 20

⁴ GenBank Accession No.: U88894 nt 458 - 435

⁵ GenBank Accession No.: AF141371 nt 573 - 589

⁶ GenBank Accession No.: AF141371 nt 1531-1515

⁷ GenBank Accession No.: AF141371 nt 404 - 386

⁸ GenBank Accession No.: AF141371 nt 1196 - 1214

⁹ GenBank Accession No.: AF141371 nt 1642 - 1660

¹⁰ GenBank Accession No.: AF141371 nt 927 - 944

¹¹ GenBank Accession No.: AF141371 nt 497 - 515

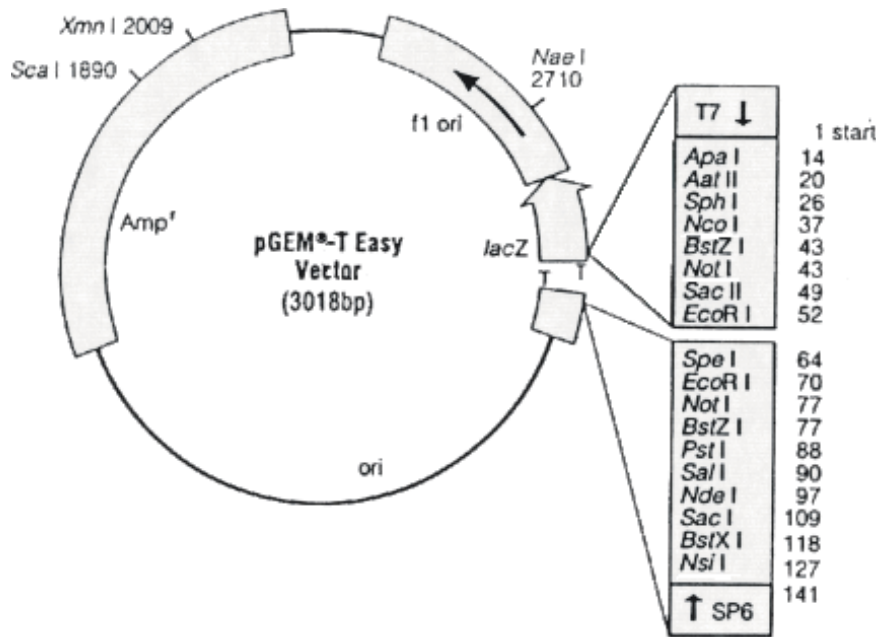


Abbildung 16: Klonierungs- und Expressionsvektor pGEM®-Teasy mit Amp^R, Primersequenzen für T7/SP6 und 3'-T-Überhängen.

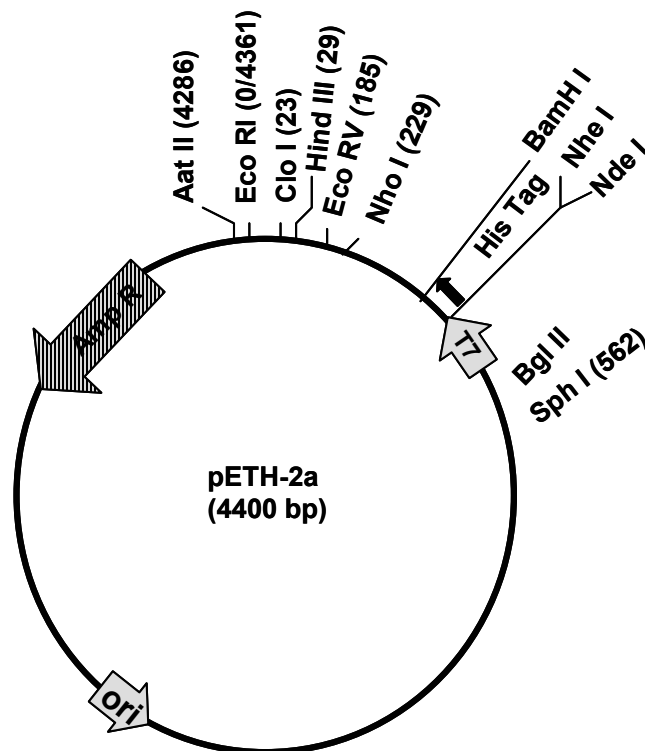


Abbildung 17: Expressionsvektor pETH-2a mit Amp^R und Primersequenz für T7

4.4 VERSUCHSTIERE – GEWEBEPROBEN

4.4.1 LEBERGEWEBEPROBEN

Zur Isolation von RNA wurde ein Versuchstier vom Interuniversitären Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln zur Verfügung gestellt. Dem unter praxisüblichen Bedingungen gehalten und gefütterten Kastraten wurden 20 mL Narcoren i.v. infundiert. Der Bauchraum des eingeschlaferten Tieres wurde entlang der Linea alba eröffnet. Lebergewebe wurde entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Das Gewebe wurde bis zur Aufarbeitung bei -75°C gelagert.

4.4.2 THYMUSGEWEBEPROBEN

Im Vergleich zum Muskelgewebe (SNOCHOWSKI et al., 1981; CLAUS et al., 1996) ist eine hohe Glucocorticoidrezeptordichte für den Thymus von MILLER et al. (1990) und MORALE et al. (1995) beschrieben, daher eignet sich dieses Gewebe für die Charakterisierung des Anti-pGCR-Antiserums besonders.

Ein Ferkel der Versuchstation Unterer Lindenhof der Universität Hohenheim wurde im Alter von fünf Wochen mit 5 mL Narcoren i.c. eingeschlafert. Innerhalb von 10 Min. post mortem wurde der Thymus freipräpariert, entnommen und in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Ein aliquoter Teil des Gewebes wurde für die Herstellung von Cytosol (siehe 4.6.1) zerkleinert, in Plastikgefäße gefüllt und in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Bis zur Analyse erfolgte die Lagerung bei -75°C im Ultrafreezer.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde ein kleines Stück des Gewebes vorsichtig in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2; RT) gewaschen und in Methanol / Eisessig über Nacht fixiert (Böck,1989). Im Anschluss wurden die Proben dann in 0,1 M Phosphatpuffer mehrmals gewaschen, kurz mit Aqua_{bidest.} gespült und mit einem Skalpell auf die gewünschte Größe geschnitten. Die Gewebestückchen wurden in 50% Ethanol überführt und einer Dehydrationsreihe, wie folgt unterzogen:

50%	Ethanol	2 Std.
70%	Ethanol	3 Std.
96%	Ethanol	4 Std.
100%	Ethanol	4 Std.
100%	Ethanol	4 Std.
	Xylol	1 Std.

Die Gewebestückchen wurden in Paraffin gegossen und 8 Std. bei 60°C im Brutschrank inkubiert, dann abgegossen, mit frischem Paraffin aufgefüllt und für weitere 60 Min. bei 60°C inkubiert. Das Gewebe wurde schnell in die endgültige Blöckchenform überführt und im Gefrierschrank zur Erstarrung gebracht. Die paraffinierten Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

4.4.3 DARMGEWEBEPROBEN

Zur Untersuchung der GCR-Konzentration und –Verteilung im Intestinaltrakt des Schweins wurden freundlicherweise Gewebeproben aus dem DFG-Projekt von Prof. Claus zur GnRH-Immunsierung unter Bearbeitung von Christine Metz zur Verfügung gestellt. Die Kastraten und Eber wurden in Stoffwechselbuchten des Versuchsstalls des Fachgebiets gehalten und erhielten eine einheitliche praxisübliche Futterration. Die Versuchstiere waren mit einem jugularen Venenverweilkatheter versehen. Zur Tötung wurden 30 mL Narcoren über den Katheter infundiert. Die Tiere wurden anschließend sofort an den hinteren Extremitäten aufgehängt und der Bauchraum entlang der Linea alba vom Sternum bis zur Schamgend eröffnet. Der Intestinaltrakt wurde am Magenausgang und am Rectum mit Darmklemmen unterbunden, durchtrennt und in einer Wanne mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung aufgefangen. Die einzelnen Darmabschnitte wurden folgendermaßen definiert:

- Duodenum direkt ausgehend vom Magen ca. 30 cm
- Jejunum in toto, direkt anschließend an das Duodenum
- Ileum, cranial vom Caecum ca. 30 cm
- Colon ascendens, caudal anschließend an das Caecum
- Colon transversum
- Colon descendendes, cranial vom Rectum ca. 30 cm

In Abbildung 18 ist der Intestinaltrakt des Schweins graphisch dargestellt. Die Entnahmestellen für die proteinanalytischen und die histologischen Untersuchungen sind eingezeichnet.

Für die proteinanalytischen Untersuchungen von Cytosol- und Kernkomponenten wurden Gewebeabschnitte von ca. 10 bis 15 cm Länge aus dem Ileum und dem Colon transversum entnommen und der Darminhalt vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Das Gewebe wurde grob zerkleinert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde es in Plastikgefäße verpackt und im Ultrafreezer bei –75°C gelagert.

Für die histologischen Untersuchungen wurden Gewebeproben mit ca. 5 cm Länge aus dem Mittelabschnitt des Duodenums, Jejunums, Colon ascendens und Colon descendens entnommen. Das Darmsegment wurde quer eröffnet und

zur Entfernung des Chymus vorsichtig in 0,1 M Phosphatpuffer geschwenkt. Die Vorgehensweise bei Fixierung und Einbettung der Gewebeproben ist unter 4.4.2 beschrieben.

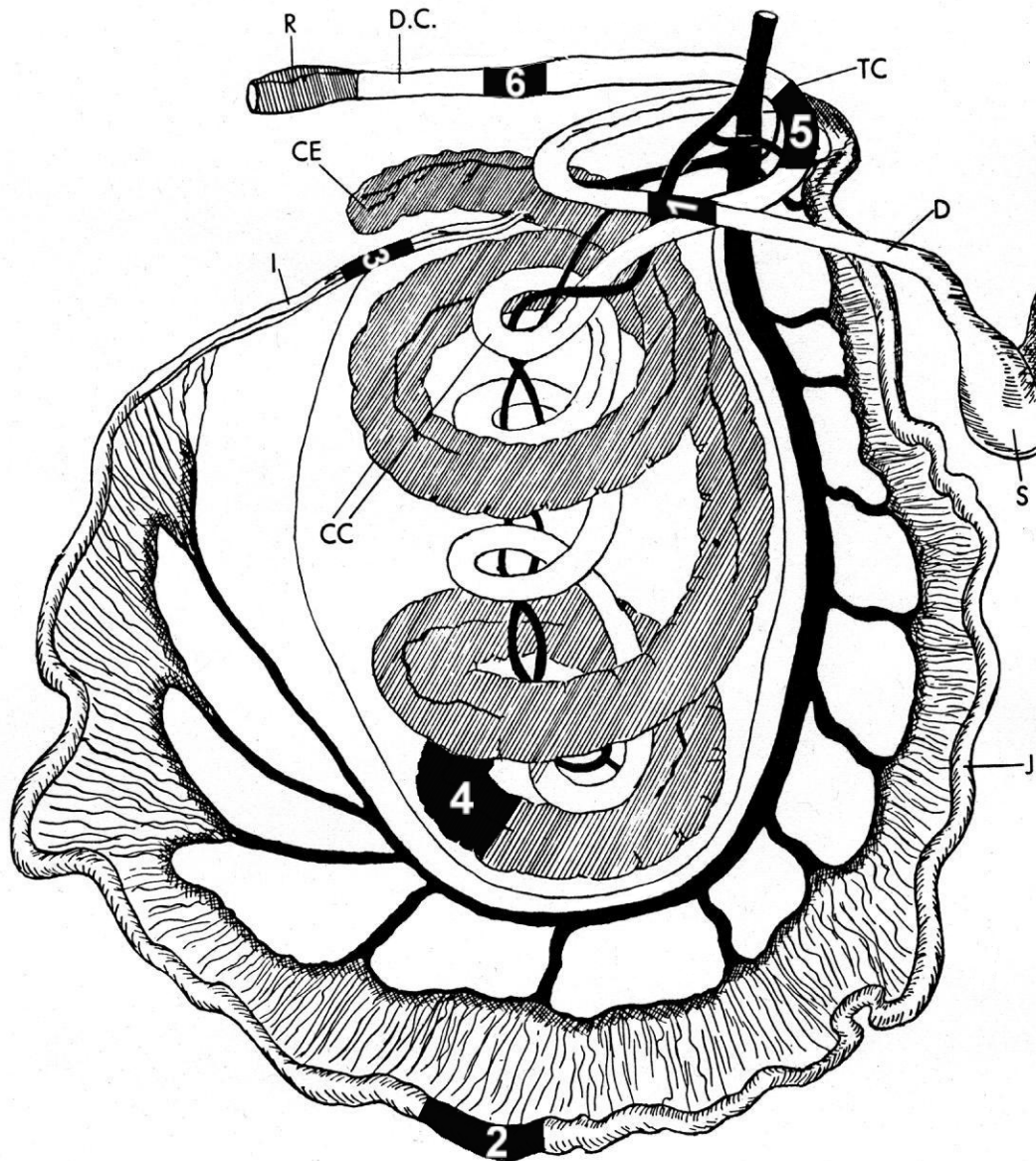


Abbildung 18: Schema des Darmkanals des Schweins
Magen (S), Duodenum (D), Jejunum (J), Ileum (I), Caecum (CE), Colon ascendens (CC), Colon transversum (TC), Colon descendens (DC), Rectum (R), Gewebesentnahmen für die Histologie (1,2,4,6), Gewebesentnahmen für die Proteinanalytik (3 und 5), (nach NICKEL et al., 1975)

4.5 MOLEKULARGENETISCHE TECHNIKEN

4.5.1 ISOLATION VON NUKLEINSÄUREN

4.5.1.1 RNA ISOLATION AUS GEWEBE

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Schweineleber mittels *TRizol[®] Reagent* (Total RNA Isolation Reagent), einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, basiert auf der Methode von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987). Nach der Auflösung der Zellstrukturen durch Homogenisation des Gewebes im Reagenz, folgt eine Chloroformextraktion, wobei vor allem Proteine denaturiert werden. Sie sammeln sich in der organischen Phase bzw. der Interphase an. Die RNA befindet sich ausschließlich in der wässrigen Phase und kann daraus mit Isopropanol gefällt werden.

Für die Isolation wurden 200 mg Gewebe mit dem Ultra Turrax in 2 mL *TRizol[®] Reagent* 15 Sek. homogenisiert und 5 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss wurden 0,4 mL Chloroform zupipettiert und der Ansatz für 15 Sek. stark geschüttelt. Nach einer weiteren Inkubation von 3 Min. bei RT wurden die Proben 15 Min. bei 4°C und 12 000 xg zentrifugiert. Die RNA-haltige wässrige Phase wurde abpipettiert und die RNA mit 1 mL Isopropanol bei 10 minütiger Inkubation (RT) gefällt. Nach der Zentrifugation (30 Min., 12 000 xg, 4°C) wurde das RNA-Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen (5 Min., 4°C, 7 500 xg), anschließend getrocknet und in 100 µL RNase freiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (siehe 4.5.3.1) bestimmt und die Qualität im denaturierenden Agarosegel (siehe 4.5.2.1) überprüft.

4.5.1.2 DNA ISOLATION AUS GEWEBE

Die DNA wurde mit dem DNA-Extraktionskit *Genomix* von Talent isoliert. Hierzu wurden 100 µg Lebergewebe in Lysepuffer 15 Sek. mit dem Ultra Turrax homogenisiert und 5 Min. bei 68°C inkubiert. Zur Isolation der DNA folgte eine Chloroformextraktion. Die in der wässrigen Phase verbliebene DNA wurde mit kationischem CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromide) selektiv gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das DNA-Pellet in hochkonzentrierter Na-Salzlösung resuspendiert und anschließend wieder mit Ethanol gefällt (siehe 4.5.1.4.2). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 4.5.3.1).

4.5.1.3 PLASMIDISOLATION

4.5.1.3.1 MINIPRÄPARATION

Die Plasmidisolierung aus Bakterien erfolgte nach alkalischer Lyse aus 3 mL "über-Nacht"-Kulturen. Dazu wurden zweimal 1,5 mL der Bakterienkultur in Eppendorfcups überführt und 15 Min. bei 800 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 250 µL P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde zur Lyse der Bakterien 250 µL frisch angesetzter P2-Puffer zugeben und 4-6 mal geschwenkt. Sodiumdodecylsulfat (SDS) wurde durch Zugabe von 250 µL P3-Puffer und 4-6 maligem Schwenken ausgefällt. Der Ansatz wurde 30 Min. bei 18 000 xg und 4°C zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Die Plasmid-DNA wurde daraus mittels Polyethylenglycol 6000 (PEG₆₀₀₀) gefällt (siehe 4.5.1.4.1). Mögliche RNA-Kontaminationen wurden anschließend in 0,8 %igem Agarosegel geprüft und (siehe 4.5.2.2) die Konzentration photometrisch (siehe 4.5.3.1) oder im Gel (siehe 4.5.3.2) bestimmt.

P1 (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 8), 0,05mg/ml RNase A)

P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS): frisch herstellen, kalt stellen

P3 (2,55 M Kacetat (pH 4,8)): pH mit Eisessig einstellen

4.5.1.3.2 MAXIPRÄPARATION

Eine 250 mL Bakteriensuspension wurde in aliquote Teile zu je 50 mL aufgeteilt und bei 800 xg, 4°C über 15 Min. zentrifugiert. Die Pellets wurden dann jeweils in 10 mL P1 resuspendiert. Anschließend wurden 10 mL P2-Puffer zugegeben und der Ansatz gut gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurden 10 mL P3-Puffer zugemischt und 60 Min. bei 40 000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 0,6 Volumenanteilen Isopropanol gefällt. Nach 15 minütiger Inkubation wurde das Präzipitat durch Zentrifugation gesammelt (15 Min., 8 000 xg, RT), zweimal mit 4 mL 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µL H₂O_{autokl.} resuspendiert. Die Konzentration wurde photometrisch und im Agarosegel bestimmt.

4.5.1.4 AUFREINIGUNG DNA-HALTIGER LÖSUNGEN

4.5.1.4.1 PEG-PRÄZIPITATION

DNA-haltige Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 mit PEG₆₀₀₀ Lösung versetzt, gut gemischt und 10 Min. bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Das Präzipitat wurde 30 Min. bei 4°C und 18 000 xg abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem eiskaltem Ethanol (5 Min., 4°C, 18 000 xg) wurde das Pellet luftgetrocknet und in einer entsprechenden Menge an zweimal autoklaviertem H₂O_{autokl.} gelöst.

PEG₆₀₀₀-Lösung (24% PEG₆₀₀₀, 3 M NaCl)

4.5.1.4.2 ETHANOLFÄLLUNG DER SEQUENZIERPRODUKTE

Zum Ansatz der Sequenzierreaktion mit einem Volumen von 10 µL wurden 10 µL H₂O, 50 µL Ethanol und 2 µL 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugesetzt und auf dem Vortex gut gemischt. Nach einer Inkubation von 10 Min. auf Eis wurde bei 4°C und 20 000 xg, 30 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in der SpeedVac 1-2 Min. getrocknet.

4.5.1.4.3 GELELUTION AUS AGAROSEGELEN

Für die Gelelution wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen elektrophoretisch, wie unter 4.5.2.2 beschrieben, aufgetrennt und die entsprechenden Gelbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem *Cleanmix DNA Purification Kit* (Talent) extrahiert. Zu etwa 200 µL Gel wurden 450 µL Cleanmix-Binding Lösung, 50 µL Cleanmix-High Purification Resin und 20 µL TBE Conditioning Lösung gegeben und zum Schmelzen der Agarose 5 Min. auf dem Rotor inkubiert. Die Lösung wurde auf die Cleanmix Filtersäule überführt (30 Sek. 18 000 xg) und einmal mit Waschlösung (30 Sek., 18 000 xg) und mit 80%igem Ethanol (1 Min., 18 000 xg) gewaschen. Der Filter wurde in ein neues Eppendorfcup überführt und die DNA mit 20 – 30 µL 70°C warmem H₂O eluiert (30 Sek., 18 000 xg).

4.5.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Das fundamentale Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Wanderung von geladenen Molekülen durch verschiedene Gele in einem extern angelegten elektrischen Feld. Dabei steht der Reibungswiderstand der elektrischen Kraft entgegen. Daraus wird abgeleitet, dass die elektrophoretische Wanderung eines Makromoleküles proportional zum Quotienten aus Nettoladung und Reibungskoeffizient ist (COMPTON & O'GRADY, 1991). Die negativ geladenen Nukleinsäuren werden somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (SHARP et al., 1973).

4.5.2.1 DENATURIERENDE RNA-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Zur Herstellung eines 1,2 %igen RNA-Agarosegels (1x MOPS Puffer, 0,66 M Formaldehyd) wurden 0,54 g Agarose in 38,25 mL H₂O_{DEPC} durch kurzes mehrfaches Aufkochen in der Mikrowelle geschmolzen. Nach der Abkühlung auf 60°C wurden 4,5 mL 10x MOPS-Puffer und 2,25 mL Formaldehyd (37%) zugeben. Das Gel wurde in einen Mini-Gelträger gegossen und der Probentaschenkamm eingesetzt. Nach dem Erkalten (1 Std.) wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x MOPS-Puffer überschichtet.

10 µg Gesamt-RNA wurden in 30 µL RNA-Ladepuffer gelöst, 15 Min. bei 70°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Zur Sichtbarmachung der RNA im UV-Licht bei 280 nm wurde den Proben nach der Abkühlung 1 µL Ethidiumbromid (1 mg/mL) zugesetzt. Die gesamte Probenmenge wurde in die Taschen pipettiert und die Elektrophorese bei einer Spannung von 12 V / cm über ca. 45 Min. durchgeführt.

RNA-Ladepuffer (2,2 M Formaldehyd, 1xMOPS, 7% Glycerol, 0,01% BPB, 50% deionisiertes Formamid)

750 µL deionisiertes Formamid
240 µL 37% Formaldehyd
165 µL 10x BPB-Ladepuffer
150 µL 10x MOPS-Puffer
122 µL H₂O_{DEPC}
72,5 µL 70% Glycerol

10x MOPS-Puffer (0,2 M MOPS, 80 mM NaAcetat, 10 mM EDTA, pH 7,2)

41,8 g MOPS
26,6 mL 3 M NaAcetat (pH5,4)
20 mL 0,5 M EDTA (pH8)
ad. 1000 mL H₂O_{DEPC}
pH 7,2 mit NaOH
lichtgeschützt lagern

4.5.2.2 DNA-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Zur elektrophoretischen Auftrennung doppelsträngiger DNA-Moleküle wurden 0,8 bis 1,2 %ige Agarosegel verwendet. Die Agarose wurde in 0,5x TBE-Puffer durch kurzes mehrfaches Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf 60°C wurden 0,5 µg/mL Ethidiumbromid zugesetzt, das Gel in eine horizontale Mini-Gelkammer gegossen und der Probentaschkamm eingesetzt.

Nach der Erstarrung wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5x TBE-Puffer verwendet.

Die Proben wurden mit einem 1/10 Volumen an 10x DNA-Ladepuffer versetzt und davon etwa 1 bis 10 μL in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 10 bis 12 V / cm über 30 Min. durchgeführt. Als Größenstandard diente der 1 Kb Plus DNA Ladder ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$); davon wurde 1 μL eingesetzt.

10x DNA-Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenykanol, 30% Glycerol)

10x TBE (1 M Tris, 0,9 M Borsäure, 10 mM EDTA, (pH 8,3))

4.5.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

4.5.3.1 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration erfolgte durch die photometrische Erfassung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Bei einer Schichtdicke von 10 mm errechnet sich die Konzentration für doppelsträngige (C_{dsDNA}), einzelsträngige DNA (C_{ssDNA}) bzw. RNA (C_{RNA}) aus der OD_{260} , einem für DNA, Oligonucleotide bzw. RNA spezifischen Multiplikationsfaktor und dem Verdünnungsfaktor (Vf) :

$$C_{dsDNA} = OD_{260} \times 50 \mu\text{g} / \text{mL} \times \text{Vf}$$

$$C_{ssDNA} = OD_{260} \times 33 \mu\text{g} / \text{mL} \times \text{Vf}$$

$$C_{RNA} = OD_{260} \times 40 \mu\text{g} / \text{mL} \times \text{Vf}$$

Die Nachweisgrenze der photometrischen Bestimmung liegt bei 2,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm, der Wert sollte dabei zwischen 1,8 und 2,0 liegen, erhält man eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung.

4.5.3.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG IM AGAROSEGEL

Geringe Mengen an Nukleinsäuren können im Agarosegel quantifiziert werden. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 ng DNA pro Bande. Zur Konzentrationsbestimmung wird nebst einem aliquoten Teil unbekannter DNA-

Menge ein DNA-Konzentrationsstandard aufgetragen. Der Konzentrationsstandard pBR322/*Mval* wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Eagle Eye II Software.

4.5.4 cDNA-SYNTHESE

4.5.4.1 REVERSE TRANSKRIPTION

Die Reverse Transkription (RT) wurde mit dem *Reverse Transcription System* durchgeführt. Die dabei verwendete *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse* Transkriptase ist eine DNA Polymerase, welche für die *first-strand complementary* DNA (cDNA)-Synthese aus langen RNA Molekülen geeignet ist. Sie weist eine schwächere RNase H (5'-Exoribonuclease) Aktivität auf.

1 µg Gesamt-RNA wurde zusammen mit 1 µg Oligo(desoxythymidin)₁₂-Primer über 5 Min. bei 70°C denaturiert. Anschließendes sofortiges Abkühlen auf Eis für 2 Min. verhindert eine Rückbildung der Sekundärstruktur und ermöglicht die Anlagerung des Oligo(dT)-Primers. Diesem *annealing*-Ansatz wurden 200 U M-MLV Reverse Transkriptase, 1 Volumenanteil M-MLV RT Reaktionspuffer, 10 mM dNTPs und 25 U Recombinate RNasin Ribonuclease Inhibitor zugesetzt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 25 µL gebracht. Die RT-Reaktion erfolgte über 1 h bei 42°C im Wasserbad. Die cDNA-Synthese wurde durch Erhitzung des Ansatzes für 10 Min. bei 95°C beendet. Die (cDNA) Produkte wurden bei -20°C gelagert. Eine Aufreinigung für die nachfolgende *second-strand* Synthese ist nicht notwendig, da der M-MLV RT Reaktionspuffer für viele Enzyme kompatibel ist. Als Negativkontrolle wurde anstatt Gesamt-RNA Wasser pipettiert. Die cDNA-Synthese wurde mittels einer Standard-PCR für Aktin (siehe 4.5.4.2.1) überprüft.

4.5.4.2 POLYMERASEKETTENREAKTION

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1986 von Mullis entwickelt. Sie findet eine breite Anwendung in der spezifischen Amplifikation einer DNA-Vorlage, dem sogenannten *template* oder der Matrize (MULLIS et al. 1986). Ein Zyklus von drei Reaktionsschritten wird bis zu 40mal durchlaufen. Der erste Reaktionsschritt eines jeden Zyklus ist die Denaturierung des Doppelstranges der *template*-DNA bei ca. 95°C. Hierbei entsteht Einzelstrang-DNA. Der zweite Reaktionsschritt, *annealing* bzw. Anlagerungsschritt, wird in einem Temperaturbereich von 45°C – 65°C durchgeführt. Die *annealing* Temperatur hängt von der Schmelztemperatur des verwendeten Primers ab. Beim *annealing* lagert sich der entsprechende Primer an den zu ihm komplementären Einzelstrang an. Im darauf folgenden dritten Reaktionsschritt, der Extension oder Elongation, werden zwei neue DNA-Stränge synthetisiert. Dabei werden die

Primer bei ca. 72°C am 3'-Ende verlängert, wobei die Reaktion durch thermostabile Polymerasen katalysiert wird. Diese beiden DNA-Stränge dienen in den folgenden Zyklen als DNA-Vorlage. Aufgrund der exponentiellen Zunahme (2^n , n: Zahl der Zyklen) an DNA sind für die PCR nur geringe Mengen an *template*-DNA erforderlich. Für die Durchführung einer PCR wird grundsätzlich ein äquimolares Gemisch aus Desoxy-Nukleotid-Triphosphat eingesetzt.

dNTP-Mix (2 mM je dNTP)

40 µL 100 mM ATP

40 µL 100 mM CTP

40 µL 100 mM GTP

40 µL 100 mM TTP

ad. 2 mL H₂O_{autokl.}

4.5.4.2.1 AKTIN-AMPLIFIKATION - KONTROLLE DER cDNA-SYNTHESE

Zur Überprüfung der cDNA-Synthese finden sogenannte „*housekeeping*“ Gene oder mRNAs Anwendung, die ubiquitär in allen Zellen exprimiert werden. β-Aktin, das an der Zellstrukturbildung beteiligt ist, kann als endogene Kontrolle für die RT-Reaktion verwendet werden. β-Aktin-cDNA kann mittels PCR mit den Primern ACT3 und ACT4 nachgewiesen werden. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µL enthält: 1,6 µM ACT3 und ACT4, 0,2 mM dNTPs, 1,6 mM MgCl₂, 1x PCR-Puffer 2 und 2 U Biotaq Thermostable DNA Polymerase. Als Matrize wurde 1 µL cDNA-Ansatz, als Positivkontrolle 200 ng genomische DNA zupipettiert. Der Reaktionsansatz wurde 2 Min. bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten 35 Zyklen im GeneAmp Thermocycler (Perkin Elmer) mit 30 Sek. 94°C, 30 Sek. 63°C und 30 Sek. 72°C. Die Amplifikationsreaktion wurde in einem 1,2 %igen Agarosegel (siehe 4.5.2.2) kontrolliert.

10x PCR-Puffer 2 (200 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, (pH 8,8))

4.5.4.2.2 PGCR-AMPLIFIKATION

Primer für die Amplifikation der porcinen GCR-cDNA wurden aus zwei kurzen porcinen Sequenzen gewählt, die in der Transaktivierungsdomäne (GR1, GenBank Accession No. U37385) und der Hormonbindungsdomäne (GR2, GenBank Accession No. U88894) lokalisiert sind. In Abbildung 18 ist die PCR Strategie schematisch dargestellt. Gemäß des humanen Rezeptors ist ein PCR-Produkt von etwa 2,1 kb zu erwarten (HOLLENBERGER et al., 1985).

Eine 50 µL PCR-Reaktion mit 1 µL *template*-cDNA, 0,5 µM GR1 (*sense*) und GR2 (*antisense*) Primer, 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 5 µL PCR-Puffer 1, 3 U

Biotaq Thermostable DNA Polymerase wurde angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 2 Min. bei 94°C denaturiert. Die PCR wurde im GeneAmp Thermocycler über 30 Zyklen mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 30 Sek. bei 94°C, 40 Sek. bei 48 / 50 / 52 / 54°C und 2 Min. bei 72°C. Bei der anschließende Inkubation über 5 Min. bei 72°C wurde die Elongation der entstandenen Amplifikate vervollständigt. Die PCR wurde auf einem 0,8 %igen Agarosegel (siehe 4.5.2.2) geprüft.

10x PCR-Puffer 1 (677 mM Tris/HCl, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween 20, (pH 8,8))

4.5.4.2.3 PRIMERDESIGN UND PGCR ANTIGENFRAGMENT AMPLIFIKATION

Anhand der Sequenzanalyse des pGCR-Amplifikates wurde ein Fragment aus der N-terminalen Domäne des GCR gewählt und aus Klon pGEMGCR2,1(B) mittels PCR amplifiziert. Unter Verwendung des 5' *sense*-Primers, erweitert um eine *Bam*H I Restriktionsschnittstelle (GR1) und einem 3' *antisense*-Primer, der sowohl ein Stopkoden enthält, als auch für eine *Hind* III Restriktionsschnittstelle kodiert (GR5), wurde ein 457 bp Fragment generiert und im Weiteren als *gcrmr* bezeichnet. Die Strategie zur Amplifikation und sowie das Primerdesign sind in Abbildung 19 schematisch dargestellt.

Die PCR-Reaktion enthielt 1 ng Plasmid pGEMGCR2,1(B), 0,5 µM GR1 und GR5, 0,2 mM dNTP-Mix, 1,6 mM MgCl₂, 1x PCR-Puffer 1, 3 U Biotaq Thermostable DNA Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µL. Die Denaturierung erfolgt über 2 Min. bei 94°C. Die Bedingungen für die PCR waren 30 Zyklen mit 30 Sek. bei 94°C, 30 Sek. bei 55°C und 30 Sek. bei 72°C. Zur Vervollständigung der Elongationsreaktion wurde abschließend noch 5 Min. bei 72°C inkubiert.

Zur Überprüfung der PCR wurden 5 µL der PCR-Reaktion auf ein 1,2 %iges Agarosegel (siehe 4.5.2.2) aufgetragen. Zur Entfernung der Oligonukleotide wurde das Amplifikat mit PEG₆₀₀₀ gefällt (siehe 4.5.1.4.1) und die Konzentration am Gel (siehe 4.5.3.2) bestimmt.

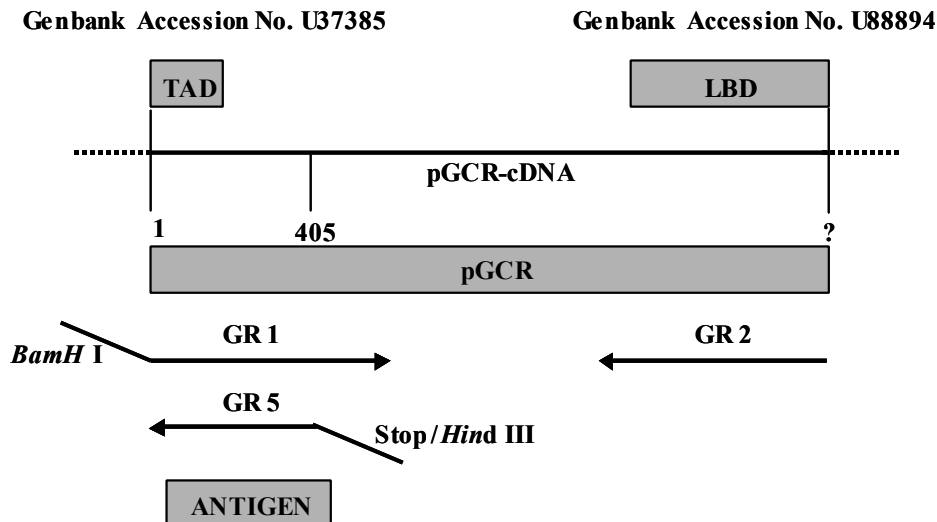


Abbildung 19: Porcine GCR-cDNA mit sequenzierten Regionen in der modulatorischen oder Transaktivierungsdomäne (TAD, GenBank Daten Accession No. U37385) und der Hormonbindungsdomäne (LBD, Genbank Accession No. U88894). Daraus resultiert die PCR-Strategie zur Amplifikation des pGCR cDNA-Fragments ohne 5'- und 3'-Ende mit den Primern GR1 / GR2 und der cDNA-Amplifikation des pGCR Antigenfragments *gcrmr* mit den Primern GR1(*BamH I*) und GR5 (*Hind III/Stop*)

4.5.4.2.4 SCREENING AUF POSITIVE PGEM UND PET KLONE

Die PCR-Produkte wurden über *TA*-Klonierung (siehe 4.5.5.3) oder über Restriktionsschnittstellen (siehe 4.5.5.1, 4.5.5.2) in den entsprechenden Sequenzier- oder Expressionsvektor ligiert und anschließend in *E. coli* XL 1 Blue vermehrt. Zur Charakterisierung der Klone, wurden die durch blau/weiß Färbung vorselektierten Kolonien mittels PCR überprüft.

Die Identifikation der pGEM und pET Klone mit richtigem vollständigem Insert erfolgte mit den Primern GR1, GR2 und GR5. Enthält der potentielle Klon das Insert wird das entsprechende Fragment amplifiziert. Der 50 µL PCR- Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 0,2 µM GR1 und GR2 oder 0,2 µM GR1 und GR5, 0,2 mM dNTP-Mix, 1,6 mM MgCl₂, 1 Volumenanteil PCR-Puffer 2, 1 U Biotaq Thermostable DNA Polymerase, ad. H₂O. Die DNA-Matrize wurde durch kurzes Eintauchen eines sterilen Zahnstochers mit der gepickten Kolonie in den PCR-Ansatz eingebracht. Für das Screening wurden folgende Temperaturprogramme gefahren: 5 Min. 94°C, 20 Zyklen mit 30 Sek. bei 94°C, 40 Sek. bei 55°C, 2 Min. bei 72°C für die pGEM Klone und 30 Sek. bei 94°C, 30 Sek. bei 55°C, 30 Sek. bei 72°C für die pET Klone und abschließend 5 Min. 72°C. Die PCR wurde auf 0,8 %igem oder 1,2 %igem Agarosegelen überprüft.

4.5.5 KLONIERUNG

4.5.5.1 SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Für die Ligation über Restriktionsschnittstellen wurden das aufgereinigte *gcrmr* PCR-Produkt und der pET Expressionsvektor mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und anschließend über die T4-Ligase kloniert. Den Restriktionsansätzen liegen folgende Berechnungen zugrunde:

- a) $(2 \times 10^6) / (660 \times \text{Anzahl der Basenpaare}) = \text{pmol Enden} / \mu\text{g dsDNA}$
- b) 1 U Enzym verdaut über Nacht 1 μg lineare pBR322 DNA = 0,7 pmol Enden

Daraus folgt, für die Hydrolyse von 0,7 pmol Enden wird 1 U Restriktionsendonuklease-Aktivität benötigt. Die restriktionsenzymatische Spaltung des PCR-Produkts wurde folgendermaßen durchgeführt:

5,85 μg *gcrmr* PCR-Produkt (41,4 pmol Enden)
50 U *Bam*H I
30 U *Hind* III
8 μL 10x *Bam*HI –Puffer
ad. 80 μL H₂O_{autokl.}

Die restriktionsenzymatische Spaltung des pET Vektors gestaltete sich wie folgt:

10 μg Vektor (6,8 pmol Enden)
10 U *Bam*H I
15 U *Hind* III
2,5 μL 10x *Bam*HI-Puffer
ad. 25 μL H₂O_{autokl.}

Beide Ansätze wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden auf ein 1,2 bzw 0,8 %iges Agarosegel (siehe 4.5.2.2) aufgetragen, die Hydrolyse kontrolliert und die erwünschten Produkte mit dem Cleanmix DNA Purification Kit (siehe 4.5.1.4.3) aufgereinigt.

4.5.5.2 KLONIERUNG DES GCRMR PCR-PRODUKTES IN DEN PETH-2A-VEKTOR

Für die Ligation des *gcrmr* Antigenfragments in den pET Expressionsvektor errechnet sich folgende Insertmenge:

$$\text{Menge Vektor (ng)} \times \text{Länge Insert (kb)} / \text{Länge Vektor (kb)} = \text{Menge Insert (ng)}$$
$$50 \text{ ng pET-2H} \times 0,417 \text{ kb} / 4 \text{ kb} = 5,2 \text{ ng Insert}$$

Für den Ligationsansatz wurde ein Vektor-Insert Verhältnis von 1:3 gewählt: 50 ng pETH-2a, 15,6 ng Insert, 5 Units T4-DNA-Ligase, 1 Volumenanteil

Ligationspuffer (MBI Fermentas), ad. 20 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{autokl.}}$. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

4.5.5.3 KLONIERUNG DES *GCR2,1* PCR-PRODUKTES IN DEN pGEM TEASY VEKTOR

Für die "sticky end"-Ligation oder TA-Klonierung in den pGEM[®]-Teasy Vektor mit Thymin-Überhängen (ZHOU, 1995; KOBS, 1995) sind Adenosin-Überhänge notwendig, welche über die sogenannte Tailing-Reaktion an das 5'- und 3'-Ende des amplifizierten Fragments angehängt werden können. Hierbei macht man sich zu Nutze, daß Taq-Polymerasen keine Fragmente mit glatten Enden, sondern meist einem unspezifischen Überhang produzieren (CLARK J.M., 1988; HU G., 1993)

Der Tailing-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 μL beinhaltete 262,5 ng *gcr2,1* Fragment, 2,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dATP, 5 Units Taq-Polymerase, 1 Volumenanteil PCR-Puffer 2. Die Reaktion wurde bei 70°C über 30 Min. durchgeführt und danach sofort in die Ligation eingesetzt. Zur Klonierung und damit zur Vermehrung und Sequenzierung wurden die *gcr2,1* PCR-Fragmente in den pGEM[®]-Teasy Vektor ligiert. Dabei ist darauf zu achten, daß maximal 1/5 des Volumenanteils des Tailingansatzes in die Ligationsreaktion eingesetzt wird. Für den Ligationsansatz errechnet sich folgende Insertmenge:

$$25 \text{ ng pGEM}^{\text{®}}\text{-Teasyx } 2,1 \text{ kb} / 3,02 \text{ kb} = 17,5 \text{ ng Insert}$$

Der Ligationsansatz setzte sich entsprechend des Verhältnisses von 1:3 folgendermaßen zusammen: 25 ng Vektor, 52,5 ng Insert, 5 Units T4-DNA-Ligase, 1x T4-DNA-Ligase Puffer in einem Endvolumen von 10 μL . Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

4.5.5.4 TRANSFER VON DNA IN *E. COLI*

4.5.5.4.1 CHEMISCHE TRANSFORMATION IN *E. COLI* XL1 BLUE

Für die Transformation wurden jeweils 0,4 μL der Ligationsansätze mit je 100 μL kompetenten *E.coli* XL1 Blue 30 Min. auf Eis, anschließend exakt 90 Sek. bei 42°C im Wasserbad und dann weitere 2 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 μL Luria Broth (LB)-Medium folgten 45 Min. Inkubation bei 37°C. Danach wurde die Bakterienkultur 5 Min. bei 600 xg abzentrifugiert und davon 600 μL Überstand verworfen.

Zur Selektion auf transformierte pGEM-Plasmid-Träger wurden 50 bzw. 100 μL der Bakteriensuspension auf LB/Ampicillin Agarplatten, die zuvor mit 10 μL Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) und 40 μL 5-Brom-4-Chlor-3-indol- β -D-galactosid (X-Gal), dem Substrat der β -Galactosidase, behandelt wurden, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Blau-weiß-Selektion beruht auf

der Unterbrechung des LacZ'-Gens, welches für die β -Galaktosidase kodiert. Bakterienkolonien, in denen das LacZ'-Gen durch die Insertation zerstört ist, bleiben weiß, während Klone ohne Inserteration die β -Galaktosidase exprimieren und sich blau färben. 12 weiße Kolonien wurden als potentielle Plasmidträger durch PCR-Screening (4.5.4.2.4) auf korrekte Inserts überprüft und die einzelnen Bakterienklone in Flüssigkultur vermehrt. Dazu wurde eine ampicillinhaltige LB-Flüssigkultur (3-4 mL) in einem Kulturröhrchen beimpft. Die Vermehrung des Klons fand bei 37°C und 220-250 Upm statt. Die positiven Klone wurden mittels einer Mini-Plasmidpräparation (siehe 4.5.1.3) aufgereinigt.

LB (Luria-Bertani) Medium (1% (w/v) Bacto Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, (pH 7,4))
 10 g Bacto Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 ad. 1 L H₂O

Festes Ampicillin LB-Nährmedium (1% (w/v) Bacto Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1,6% (w/v) Agar, 100 μ g/L Ampicillin)
 16 g Agar
 1 mL Ampicillin-Stammlösung
 ad. 1 L LB-Medium

LB/Amp-Medium (100 μ g/mL Ampicillin)
 1 mL Ampicillin-Stammlösung
 (100 mg/mL)
 ad. 1 L LB-Medium

LB/Chloramph-Medium (20 μ g/ml Chloramphenicol)
 2 mL Chloramphenicol-Stammlösung (10 mg/mL)
 ad. 1 L LB-Medium

4.5.5.4.2 ELEKTROPORATION

4.5.5.4.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation wurden 5 mL LB/Chloramph. mit *E. coli* BL21 (DE3) pLysS beimpft und über Nacht bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 inkubiert. Die Vorkultur wurde in 1 L LB/Chloramph. überführt und bis zu einer OD bei 595 nm von 0,6 bis 0,8 inkubiert. Die Zellen wurden bei 800 xg für 15 Min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 0,5 L kaltem H₂O_{autokl.}, einmal mit 10 % Glycerin gewaschen und zum Schluß in 2,5 mL 10 % Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 40 μ L Portionen aufgeteilt und bei -75°C gelagert.

4.5.5.4.2.2 Transformation

40 μ L kompetente *E. coli* BL21 (DE3) pLysS und 1 ng Plasmid wurden 5 Min. auf Eis inkubiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Küvette wurde in den E.coli Pulser Apparat von Bio Rad eingesetzt und ein Spannungsimpuls von 2,5 Volt angelegt. Anschließend wurde sofort 1 mL LB-Medium zupipettiert, in ein Eppendorfcup überführt und 30 Min. bei 37°C und 120 Upm geschüttelt. 100 μ L dieser Suspension wurden auf eine LB/Chloramph/Amp-Agarplatte ausplattiert. Die restlichen 900 μ L wurden abzentrifugiert und 700 μ L

des Überstandes verworfen. 100 µL dieser resuspendierten Zellen wurden wie oben beschrieben ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht (37°C).

4.5.5.5 PLASMIDVERMEHRUNG

Die Transformanten wurden für die Mini-Plasmidisolierung jeweils in 3 mL LB/Amp-Medium angezchtet. Die Kulturen wurden 8 – 16 Std. bei 37°C im Schüttler inkubiert. Für Maxipräparationen wurden 250 mL LB/Amp-Medium inokuliert.

4.5.6 SEQUENZANALYSE DOPPELSTRÄNGIGER DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der von Frederick Sanger entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode (SANGER et al., 1977). Dabei werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente erzeugt, hervorgerufen durch eine kontrollierte Unterbrechung der Synthese mittels spezifischer Terminatoren (2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate, ddNTPs), die zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden zum Reaktionsansatz gegeben werden. Die ddNTPs besitzen an ihrer 3'-Position keine OH-Gruppe. Dadurch kann ein entstehendes DNA-Fragment, nach statistischem Einbau eines Terminators, nicht mehr durch die Ausbildung weiterer Phosphodiester-Bindungen zum nächsten anzuhängenden 2'-Desoxynukleotid verlängert werden. Es kommt zum Kettenabbruch. Bei der automatischen Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377 DNA sequencer sind die vier ddNTPs mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und werden zusammen in einer Spur des Polyacrylamidgels aufgetrennt. Nach der Elektrophorese neu synthetisierter Fragmente, kann direkt aus dem Signalmuster die DNA-Sequenz abgelesen werden.

Der Ansatz zur Sequenzierreaktion wurde mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit angesetzt. Die Sequenz wurde mit den Sequenzierprimern T7, M13rev, GR3, GR4, GR6, GR7 und GR8 aus 2 Richtungen eingelesen. Der Reaktionsansatz enthielt 5 pmol Sequenzierprimer, 500 ng DNA, 2 µL Ready Reaction Mix in einem Gesamtvolumen von 10 µL. Die PCR wurde mit 25 Zyklen á 96°C für 10 Sek., 50°C für 5 Sek. und 60°C für 4 Min. durchgeführt. Die Sequenzierprodukte wurden anschließend durch Ethanolfällung gereinigt (siehe 4.5.1.4.2) und in 4 µL Loading Dye (Amersham) durch kräftiges Schütteln mit dem Vortex gelöst.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben 2 Min. bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht nach dem vom Hersteller empfohlenen Programmparametern (2500V, 40 mA, 30 W) auf einem 4,5% denaturierendem Polyacrylamidgel. Die Probe wurden auf das

vorgewärmte (50°C) Gel geladen und über 16 Std. aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit der "Sequence Navigator" Software. Als Anoden-Elektrophoresepuffer wurde 0,5x TBE und als Kathodenpuffer 1x TBE verwendet.

4.5.7 REKOMBINANTE EXPRESSION

Das T7-RNA-Polymerase-Promotor-System eignet sich besonders zur Überexpression von Genen in *E. coli* (TABOR & RICHARDSON, 1985). Die T7-RNA-Polymerase ist sehr aktiv und sehr selektiv für ihren eigenen Promotor. Im Expressionsvektor pETH-2a wird das zu exprimierende Gen unter die Kontrolle des T7-Promotors gestellt. Die Expression erfolgt im *E.coli*-Stamm BL21 (DE3), der das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren lac-Promotors trägt. Die Induktion der Expression der T7-RNA-Polymerase und somit auch des rekombinanten Gens erfolgt durch Zugabe von IPTG (STUDIER & MOFFAT, 1986; STUDIER et al., 1990).

4.5.7.1 KULTIVIERUNG IM SCHÜTTELKOLBEN

Eine Vorkultur wurde durch Animpfen von 1 L LB-Medium mit 20 µg/mL Ampicillin mit einer kleinen Kolonie der transformierten Bakterien und anschließender Vermehrung über Nacht im Schüttler (120 Upm) hergestellt. Die „über-Nacht“-Kultur wurde bis zu einer OD₅₇₅ von 0,6 inokuliert. Anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch die Zugabe von 1 M IPTG und das Aufheizen des Fermenters auf 37°C für 3 h induziert (130 Ump). Abschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (800 xg, 15 Min.) geerntet. Eine Negativ- und Positivkontrolle wurde von der nichtinduzierten bzw. induzierten Bakteriensuspension entnommen (1 mL) und abzentrifugiert (15 Min., 800 xg).

4.6 PROTEINANALYTISCHE METHODEN

4.6.1 HERSTELLUNG VON CYTOSOL- UND KERNFRAKTIONEN

Alle Arbeitsschritte zur Gewinnung einer Cytosol- und Kernfraktion aus Gewebe wurden bei Temperaturen zwischen 0 und 4°C durchgeführt. Tiefgefrorene (-75°C) Gewebeprouen (2 g) wurden evtl. mit dem Skalpell vorzerkleinert und anschließend in 2 Volumenanteilen Lysepuffer unter Kühlung mit Eis zweimal 30 Sek. mit dem Ultra-Turrax homogenisiert, wobei zwischen den Zerkleinerungsschritten der Homogenisationsstab in Eiswasser gekühlt wurde. Die Homogenate wurden 15 Min. bei 4°C und 800 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Gewinnung des Cytosols in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und in der Ultrazentrifuge 60 Min. bei 1°C und 100 000 xg zentrifugiert. Das Pellet mit den Kernkomponenten wurde zweimal mit 8 mL eiskaltem TE-Puffer gewaschen (15 Min., 4°C, 800 xg) und nachfolgend in 3 mL TE-Puffer inkl. 0,5 M KCl mit dem Ultra-Turrax zweimal 30 Sek. homogenisiert. Das Kernhomogenat wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und ebenso 60 Min. bei 1°C und 100 000 xg zentrifugiert.

2x Lysestamppuffer (20 mM Tris (pH 7,4), 10% Glycerol, 0,05% Triton-X 100)

Lysepuffer (1x Lysestamppuffer, 20 mM Natriummolibdat, 1 mM Dithiothreitol, Protease-Inhibitor)

TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, (pH 7,4))

Der partikelfreie Überstand der Cytosol- und Kernfraktion wurde abpipettiert und der Proteingehalt nach BRADFORD (1976) nach einer am Fachgebiet etablierten Methode im Mikrotiterplattenformat bestimmt. Die Fraktionen wurden in aliquoten Teilen bei -75°C gelagert.

4.6.2 RADIOAKTIVE MARKIERUNG DES CYTOSOLISCHEN GCR

Dexamethason, ein synthetisches, fluoriertes Glucocorticoid, weist eine fünffach höhere Affinität ($K_d = 0,4 - 1 \text{ nM}$) zum Rezeptor auf als sein natürlicher Ligand Corticosteron bei der Ratte (REUL, 1985).

Zur radioaktiven Markierung wurden 500 μL Thymuscytosol mit einer Proteinkonzentration von 10,26 mg / mL, mit 10 nM ^3H -Dexamethason (Gesamtbindung = GB) über Nacht bei 4°C im Rotorschüttler inkubiert. Zur Überprüfung nicht spezifischer Bindungen (NSB), z.B. durch Transcortin oder

Albumin, wurde parallel ein Reaktionsansatz mit einem 200-fachen Überschuß an nicht tritiiertem Dexamethason durchgeführt. Das tritiierte Hormon wird dabei durch den Überschuß an unmarkiertem Hormon am Rezeptor verdrängt. Die Differenz der GB und NSB zeigt damit eine spezifische Bindung an.

Zur Fällung des Proteins wurden anschließend zum GB- und NSB-Ansatz 290 µL (35 %) einer gesättigten eiskalten Ammoniumsulfatlösung zugegeben und 30 Min. auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (30 Min., 4°C, 5 000 xg) gewonnen, der Überstand verworfen und das Pellet in 2x SDS-Ladepuffer gelöst. Die Präzipitate des GB- und NSB-Ansatzes wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (siehe 4.6.5.3.6 und 4.6.7)

2x SDS-Ladepuffer (30% Glycerol, 2% SDS, 0,1 M Tris (pH 6,8), 0,1 M Dithiothreitol, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylen Cyanit)

4.6.3 AUFREINIGUNG REKOMBINANTER PROTEINE AUS E.COLI-KULTUR

Rekombinante DNA-Techniken ermöglichen die Konstruktion von Fusionsproteinen, in denen die gewünschte Proteinsequenz mit einem spezifischen Affinitäts-Tag gekoppelt ist und damit die affinitätschromatographische Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine stark vereinfacht. Ein solcher Affinitäts-Tag kann beispielsweise aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen bestehen. Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) weist eine hohe Affinität und Selektivität zu Proteinen mit einem His-Tag auf. Die Histidinseitenketten bilden mit den Ni-Ionen unter neutralen Bedingungen einen Metall-Chelat-Komplex. Mittels eines pH-Gradienten können die Fusionsproteine eluiert werden .

Zwei Zellpellets aus je 1 L Bakterienkultur wurden jeweils in 50 mL Puffer A (pH 8,0) resuspendiert und 1 Std. unter Rühren inkubiert. Die Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 40 000 xg über 30 Min. und RT abgetrennt. Zum Überstand wurden jeweils 2 mL equilibrierte Ni-NTA-Agarose gegeben und 3 Std. bei RT inkubiert; nach der Zentrifugation (1000 xg, 15 min. RT) in 50 mL Puffer A und anschließend in 50 mL B (pH 8,0) gewaschen. Die Ni-NTA-Agarose-Pellets wurden in 4 mL Puffer B resuspendiert und die Poly-Prep Säulen (Bio-Rad) befüllt. Eine Säule wurde anschließend mit 15 mL Puffer D (pH 6,3) gewaschen und mit 10 mL Puffer E (pH 4,5) eluiert. Dabei wurden 1 mL Fraktionen gesammelt. Die zweite Säule wurde mit 15 mL Puffer C (pH 6,8) und anschließend mit 10 mL

Puffer D (pH 6,3) gewaschen. Die Elution erfolgte wie beschrieben mit 10 mL Puffer E. In den einzelnen Fraktionen wurden die Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976) bestimmt. Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (siehe 4.6.5.3) überprüft. Reine hochkonzentrierte Fraktionen wurden in PBS-Puffer dialysiert. Fraktionen mit einem hohen Anteil unbestimmter Proteine wurde mittels präparativer SDS-PAGE weiter aufgereinigt (siehe 4.6.5.3.2).

Puffer A (6 M Guanidin/HCl, 0,1 M NaH₂PO₄, 20 mM β-Mercaptoethanol (pH 8))

57,3 g Guanidin/HCl
1,56 g NaH₂PO₄ · 2H₂O
140 µL β-Mercaptoethanol
ad. 100 mL H₂O_{autokl.}

Puffer B (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, 20 mM β-Mercaptoethanol (pH 8))

48 g Harnstoff
1,56 g NaH₂PO₄ · 2H₂O
1 mL 1M Tris
140 µL β-Mercaptoethanol
ad. 100 mL H₂O_{autokl.}

Puffer C (siehe Puffer B, pH 6,8)

Puffer D (siehe Puffer B ,pH 6,3)

Puffer E (siehe Puffer B, pH 4,5)

pH mit HCl einstellen

4.6.4 DIALYSE

Reine Eluate wurden zur Entfernung von Salzen dialysiert. Dazu wurde der Dialyseschlauch nach Angaben des Herstellers (Roth) in 10 mM NaHCO₃ und 10 mM Na₂EDTA vorgereinigt und in 50%igem Ethanol im Kühlschrank gelagert. Für die Dialyse wurde der Schlauch in MilliQ gewaschen, in kaltem PBS-Puffer 1 (pH 7,4) equilibriert und auf Dichtheit überprüft. Mit der Pipette wurden die Fraktionen eingefüllt (für 1 mL ca. 5 cm Dialyseschlauch) und der Dialyseschlauch mit Klemmen verschlossen. Die Dialyse erfolgte über 3 Tage jeweils gegen 1 L PBS-Puffer 1 (pH 7,4) unter schwachem Rühren bei 4°C. Der Puffer wurde insgesamt 3 mal gewechselt – zweimal am Tag 1, einmal am Tag 2. Das Dialysat wurde entnommen und der Proteingehalt nach BRADFORD (1976) bestimmt. Die Lagerung fand bei –20°C statt.

PBS-Puffer 1 (150 mM NaCl, 50 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, KH₂PO₄ (pH 7,4))

4.6.5 POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Mittels PAGE können Proteine in analytischem oder präparativem Maßstab aufgrund der Länge ihrer Proteinkette aufgetrennt werden (LAEMMLI, 1970). Dabei wandern die Proteine unter dem Einfluß des angelegten elektrischen Feldes durch die Poren eines Polyacrylamidgels, wobei die Wanderungsrichtung und –geschwindigkeit von der Ladung der Proteine, der Porengröße des Gels und der angelegten Spannung abhängt. Die Proteine werden durch Bindung des

Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) proportional zu ihrer Größe negativ geladen (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste) und denaturiert, wodurch die Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht erfolgt.

4.6.5.1 HERSTELLUNG VON SDS-POLYACRYLAMIDGELEN

Zunächst wurden mit Ethanol gereinigte Glasplatten in die Gieskammer mit entsprechenden Abstandshaltern eingesetzt und die Trenngellösung luftblasenfrei bis ca. 2,5 cm unter den oberen Rand gegossen. Zur Entfernung von Luftblasen an der Oberfläche und zur Begradigung des Gelrandes wurde das Trenngel mit ca. 1 mL Isobutanol vorsichtig überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels (1 Std. bei RT) wurde das Isobutanol abgegossen, die Sammelgellösung auf das mit Aqua_{bidest} gespülte Trenngel gegossen und der Probenaschenkamm eingesetzt. Nach einer weiteren Polymerisationszeit von 1 Std. wurde der Probenaschenkamm entnommen und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Anoden- und Kathodenkammer wurden mit insgesamt 250 mL einfach konzentriertem SDS-Elektrophoresepuffer aufgefüllt, die Taschen mit Puffer gespült und der Molekulargewichts-Standard und die Proben aufgetragen.

15% Trenngel (15% Acrylamid/Bisacrylamid, 378 mM Tris base (pH 8,8) , 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,04% TEMED

5,7 mL H₂O_{bidest}.

12,5 mL 30% Acrylamid/Bisacrylamid

Acrylamid/Bisacrylamid

6,3 mL Tris base (pH 8,8)

0,25 mL 10% SDS

0,25 mL 10% APS

0,01 mL TEMED

5% Sammelgel (5% Acrylamid/Bisacrylamid, 50 mM Tris base (pH 6,8), 1%, SDS, 1% APS, 0,01% TEMED

6,8 mL H₂O_{bidest}.

1,7 mL

1,25 mL Tris base (pH 6,8)

0,25 mL 10% SDS

0,25 mL 10% APS

0,01 mL TEMED

8 % Trenngel (8% Acrylamid/Bisacrylamid, 378 mM Tris base (pH 8,8) , 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,04% TEMED

5,7 mL H₂O_{bidest}.

12,5 mL 30% Acrylamid/Bisacrylamid

6,3 mL Tris base (pH 8,8)

0,25 mL 10% SDS

0,25 mL 10% APS

0,01 mL TEMED

5x SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS (pH 8,3))

15,1 g Tris

94 g Glycin (electrophor. grade)

50 mL 10% SDS-Lösung

ad. 500 mL H₂O_{autokl}.

4.6.5.2 MOLEKULARGEWICHTS-STANDARDS

Als Molekulargewichts-Standard wurden entweder 10 µL Prestained SDS-PAGE Standard Broad Range (Bio-Rad) oder 10 µL BenchMark™ Prestained Protein Ladder (GibcoBRL) nach dem Protokoll des Herstellers aufgetragen.

Der ECL Protein Molekulargewichts Marker von Amersham Pharmacia Biotech ist mit Biotin markiert und daher speziell für Western Blots geeignet, zumal damit leicht der Transfer überprüft werden kann. 0,75 µL des Markers wurden mit 4 µL 4x SDS-Ladepuffer versetzt, denaturiert (5 Min., 95°C) und aufgetragen. Die Detektion auf dem Blot erfolgt mit Streptavidin-HRP in einer Verdünnung in TTBS von 1:4000 (30 Min. bis 1Std.) und dem ECL Western blotting Detektionsreagenz.

In Tabelle 5 sind die Proteine des Bio-Rad und Amersham Pharmacia Markers und deren Molekulargewicht aufgelistet.

Protein Molekulargewichts-Standards

	<u>Broad Range (kDa)</u>	<u>ECL Marker (kDa)</u>
Myosin	188	-
β-Galaktosidase	108	-
Phosphorylase B	-	97
BSA	68	66
Ovalbumin	48,5	45
Carboanhydrase	33,4	31
Trypsininhibitor	28,5	20,1
Lysozym	20,8	14,4
Aprotinin	7,3	-

Für den BenchMark™ Prestained Protein Ladder von GibcoBRL besteht keine nähere Spezifikation. Er enthält ein Proteingemisch mit den folgenden Größen: 187, 90, 61, 40, 45, 20, 15,7 kDa.

4.6.5.3 PROBENVORBEREITUNG UND –AUFTRAG

4.6.5.3.1 EXPRESSIONSKONTROLLE

Aus Aufreinigung 1 und 2 des rekombinanten pGCRmr Proteins wurden Zellpellets aus 1 mL der nichtinduzierten (Negativkontrolle) und induzierten Bakterienkultur (Positivkontrolle) (siehe 4.5.7.1) in 200 µL vierfach konzentriertem (4x) SDS-Ladepuffer resuspendiert. 15 µL des Waschpuffers C oder D bzw. 1 µg der Waschfraktionen D und 1 µg Protein der Eluate aus der Aufreinigung des rekombinanten pGCRmr Antigens wurden mit einem viertel Volumenanteil des SDS-Ladepuffers gemischt und jeweils 5 Min. bei 95 °C denaturiert. Um eine Renaturierung zu unterbinden wurde der Ansatz anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte in einem 15 %igen Trenngel. Das Auftragsvolumen der Negativ- und Positivkontrolle betrug je 10 µL. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt (siehe 4.6.6).

4.6.5.3.2 AUFREINIGUNG DES REKOMBINANTEN PGCRM PROTEINS

1400 µg pGCRmr Protein aus Eluat 2 der Aufreinigung 2 wurden in einem achteel Volumenanteil des achtfach konzentrierten SDS-Ladepuffer aufgenommen, 5 Min. bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis 3 Min. abgekühlt. Die Proben wurden auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit einer großen Probentasche geladen. Nach der Elektrophorese und der Coomassie Blau Färbung wurde die 15 kDa Bande ausgeschnitten und in PBS-Puffer 1 mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Dieses Homogenat wurde direkt für die Immunisierung (siehe 4.7.1) verwendet.

4.6.5.3.3 VERDÜNNUNGSREIHE PGCRM UND CYTOSOLISCHES PROTEIN

Das dialysierte pGCRmr Protein wurde in PBS-Puffer (pH 7,4) wie folgt verdünnt und 2:1 mit 2x SDS-Ladepuffer gemischt. Die Denaturierung erfolgte bei 96°C über 4 Min.

100	ng / µL
50	ng / µL
25	ng / µL
12,5	ng / µL
6,25	ng / µL
3,13	ng / µL
1,79	ng / µL
0,39	ng / µL

Die Proben wurden auf ein 15 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Protein auf eine PVDF-Membran geblottet (siehe 4.6.7).

Thymuscytosol mit einem Proteingehalt von 10,26 mg / mL wurde mit einem achteel Volumenanteil an 8x SDS-Ladepuffer gemischt und 5 Min. bei 95 °C denaturiert. Nach der Abkühlung auf Eis wurden entsprechend 200, 100, 50, 25, 12,5 und 6,25 µg cytosolisches Protein pro Spur eines 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran.

4.6.5.3.4 BESTIMMUNG DER ANTI-PGCRM-IGG-BINDUNGSKAPAZITÄT

Zur Charakterisierung der Anti-pGCRmr-IgG-Bindungskapazität wurden in einem 8 %igen Polyacrylamidgel pro Spur 100 µg cytosolisches Thymusprotein und 100 µg cytosolisches Protein aus Colonomogenat nach der wie oben beschriebenen Denaturierung in SDS-Ladepuffer aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert.

4.6.5.3.5 SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG DER GCR VERTEILUNG IM DARMTRAKT

Zur Bestimmung der GCR Verteilung und zur Charakterisierung des Einflusses der Androgene auf die GCR Konzentration im Intestinaltrakt wurden pro Spur eines 8 % Polyacrylamidgels jeweils 100 µg cytosolisches Protein des Ileums und des Colon transversum der Eber und Kastraten aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Weiterhin wurden zur vergleichenden Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des Rezeptors jeweils 100 µg Protein der Kernfraktion der Eber und Kastraten im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für die Probandenaturierung wurden 50 µL Cytosol oder Kernfraktion mit 6,5 µL 8x SDS-Ladepuffer gemischt und bei 95 °C für 5 Min. denaturiert. Anschließend wurde nach Abkühlung die entsprechende Probenmenge in die Taschen des Gels pipettiert.

4.6.5.3.6 WANDERUNG DES RADIOAKTIVMARKIERTEN GCR IM POLYACRYLAMIDGEL

Die Migration des ³H-Dexamethason markierten Rezeptors in der SDS-PAGE wurde bestimmt. Dazu wurden die Präzipitate des GB- und des NSB-Ansatzes (siehe 4.6.2) in 200 µL 2x SDS-Ladepuffer resuspendiert und für 2 Min. bei 95°C denaturiert. Jeweils 45 µL der beiden Ansätze wurden in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Nach dem Transfer wurden die Spuren im β-Zähler auf ihre Radioaktivität überprüft (siehe 4.6.8)

4.6.5.4 BEDINGUNGEN DER ELEKTROPHORESE

Die Elektrophorese erfolgte bei 8 V / cm bis die Proben in das Gel eingewandert waren und bei 15 V / cm bis die BPB-Front das Gelende erreicht hatte, bzw. aus dem Gel in den Elektrophoresepuffer gewandert war. Nach der Elektrophorese sind die Gele für die Proteinfärbung z.B. mit Coomassie Blau oder für das Proteinblotting auf PVDF- oder Nitrocellulosemembranen einsetzbar.

4.6.6 COOMASSIE BLAU FÄRBUNG

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel dreimal 10 Min. in entionisiertem H₂O gewaschen und in einem mehrfachen Gelvolumen 0,05%iger Coomassie Brilliant Blue R-250 Lösung (ca. 50 mL) gefärbt. Entfärbt wurde das Gel durch mehrmaliges waschen in entionisiertem H₂O. Bei präparativen Gelen wurde die entsprechende Proteinbande ausgeschnitten und bei -20°C gelagert. Zur Dokumentation wurden die Gele in Cellophanfolie bei 80°C über 2 h im Geltrockner eingeschweißt.

0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250 Lösung

4.6.7 WESTERN BLOTTING

Unter Western Blotting versteht man die Überführung von Proteinen aus Trenngelen auf eine immobilisierte Matrix. Die Effektivität des Transfers der Makromoleküle kann durch Nutzung eines elektrischen Feldes – ElektrobloTTing - wesentlich erhöht werden. BloTTing-Verfahren vereinen das hohe Auflösungsverfahren der Elektrophorese mit der Spezifität des Nachweises der Moleküle auf der immobilisierten Membran. Beim Semidry-ElektrobloTTing erfolgt der Transfer zwischen zwei horizontal angeordneten Plattenelektroden, die ein hohes elektrisches Feld bei einem hohen Spannungsgradienten garantieren. Die Transfermembran sowie das Trenngel sind zwischen zwei Puffer getränkte Filterlagen eingebettet.

Für die Charakterisierung des Antiserums wurden die Proteine (pGCRmr-Antigen, cytosolische und nukleare Proteine) durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF- oder Nitrocellulosemembran gebloTTet. Hierzu wurden die Gele 20 Min. in Transferpuffer equilibriert. Die zugeschnittene PVDF-Membran wurde einige Sekunden in 100 % Methanol geschwenkt, danach 5 Min. in H₂O eingeweicht und anschließend 10 Min. in Transferpuffer equilibriert. Die Nitrocellulosemembran wurde in H₂O angefeuchtet und in Transferpuffer 10 Min. equilibriert. Die auf die Größe des SDS-Gels zugeschnittenen Filterpapier (Whatman) wurden ebenso in Transferpuffer getränkt. Die so vorbereiteten Materialien wurden in der BloTTing-Apparatur schichtweise (als Sandwich) von unten (Anode) nach oben (Kathode) in der folgenden Reihenfolge übereinander gelegt: 3 Filter, PVDF- oder Nitrocellulose-Membran, SDS-Gel, 3-4 Filter. Das BloTTen erfolgte für 2-4 h bei 1 mA / cm².

Nach dem Transfer wurde die Membran 10 Min. in TBS gewaschen, um Gelreste und SDS zu entfernen. Anschließend wurde die Membran entweder getrocknet, in Whatman Filterpapier verpackt und im Kühlschrank gelagert, oder direkt in die Immunodetektion eingesetzt.

Transferpuffer (25 mM Tris base, 190 mM Glycin , 0,05 % SDS, 20% Methanol)

TBS (10 M Tris (pH7,4), 150 mM NaCl)

Bei nachfolgender Immunodetektion wurden die getrocknete PVDF-Membranen vorher kurz (5 Sek.) mit Methanol benetzt und 5 Min. in Aqua_{bidest.} angefeuchtet, dann folgte der TTBS-Waschritt. Nitrocellulosemembranen wurden mit H₂O befeuchtet (5 Min.) und dann in TTBS gewaschen.

4.6.8 LOKALISIERUNG DES ³H-DEXAMETHASON MARKIERTEN GCR AUF NITROCELLULOSE MEMBRANEN

Vom Blot des unter 4.6.5.3.6 beschriebenen SDS-Polyacrylamidgels wurden die Spuren des GB-Ansatz und des NSB-Ansatzes abgeschnitten und jeweils in 1 mm Sektionen geschnitten. Die Millimeter-Sektionen wurden in 7 mL Szintillationsflüssigkeit (Szintillationsgefäße) aufgenommen und stark geschüttelt. Anschließend erfolgte die zweiminütige Messung im β -Zähler.

4.7 HERSTELLUNG EINES POLYKLONALEN ANTISERUMS

4.7.1 IMMUNISIERUNG

Für die Immunisierung eines Kanninchens wurden 40 µg dialysiertes (siehe 4.6.4) und 40 µg pGCRmr-Antigen Protein aus der präparativen SDS-PAGE (siehe 4.6.5.3.2) mit 0,5 mL Freund's kompletem Adjuvants emulgiert und sowohl s.c. als auch i.m. an je zwei Stellen injiziert. Nach 4, 8, 12 Wochen, gefolgt von weiteren Boosterinjektionen alle 6 Wochen wurden weitere 80 µg Antigen in 0,5 mL Freund's inkompletem Adjuvants injiziert. Entsprechend der Boosterungen wurde alle 4 bzw. 6 Wochen ca. 8 mL Blut aus der Ohrvene entnommen. Weiterhin wurden vor der ersten Immunisierung 10 mL Blut zur Herstellung von Präimmenserum abgenommen.

Nach der Gerinnung wurde das Blut zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Das Antiserum wurde bei -20°C gelagert.

4.7.2 IGG PRÄZIPITATION

Eine IgG Fraktion des Antiserums (S9) nach der achten Boosterung wurde durch Fällung mit Natriumsulfat und anschließender Dialyse gegen PBS angereichert. Dazu wurde 1 mL Antiserum in ein Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und schrittweise 180 mg Na₂SO₄ unter ständigem Schütteln mit dem Vortex-Gerät zugeben und für ca. 5 weitere Min. geschüttelt. Es folgte eine 3 stündige Inkubation bei RT. Zu diesem Ansatz wurden 10 mL 18 % Na₂SO₄ in PBS-Puffer 2 gegeben und 10 Min. bei 15 000 xg in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit nochmals 10 mL 18 % Na₂SO₄ in PBS-Puffer 2 gespült. Das Präzipitat wurde in 5 mL PBS-Puffer 2 aufgenommen, in einen Dialyseschlauch überführt (Ausschlußvolumen 12.000 – 14.000) und gegen 2 L PBS-Puffer 2 24 Stunden im Kühlschrank dialysiert. Ein Pufferwechsel erfolgte nach 12 Stunden. Der Proteingehalt wurde mit der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmt.

PBS-Puffer 2 (10 mM NaH₂PO₄, 30 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0,01% (w/v) Thimerosal (pH 7,2))

4.8 IMMUNOLOGISCHE METHODEN

4.8.1 IMMUNODEKTION VON IMMOBILISIERTEN PROTEINEN AUF MEMBRANEN

Erfolgt der Nachweis von immobilisierten Proteinen durch Immunreaktionen, spricht man von Immunoblotting (Immunologische Arbeitsmethoden, 1991). Der spezifische Nachweis membranfixierter Proteine kann entsprechend dem Prinzip des Festphasen-Immunoassays vorgenommen werden. Dazu müssen nicht besetzte Bindungsstellen der Membran durch Proteine oder Detergenzien abgesättigt werden (Blockierung/Quenching). Der Nachweis erfolgt im allgemeinen durch einen indirekten Test, dazu werden sekundäre Antikörper eingesetzt, welche mit Enzymen, Metallen, Radioisotopen oder Fluorochromen markiert sind.

Die wesentlichen Schritte des Immunoblotting lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Trennung der Antigene (siehe 4.6.5)
- Transfer des Proteins auf eine immobilisierende Membran (siehe 4.6.7)
- Blockierung freier Bindungsstellen der Membran
- Inkubation mit dem primären Antikörper
- Waschprozeß (Entfernung von überschüssigem und nicht spezifisch gebundenem Antikörper)
- Inkubation mit dem markierten sekundären Antikörper (Sonde)
- Waschprozeß
- Nachweisreaktion

Peroxidasemarkierte Antikörper katalysieren die Oxidation von Luminol, Antikörper konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP) katalysieren die Umwandlung von CSPD und beide lösen damit eine Chemilumineszenz aus; das entstehende Licht wird über einen speziellen sehr lichtsensitiven Film detektiert (GÜLTEKIN & HEERMANN, 1988; BLAKE et al., 1984). Die Reaktion ist quantifizierbar, in dem der Film eingescannt und densitometrisch ausgewertet werden kann. Die ECL-Reaktion ist ca. zehnmal sensitiver (im pg-Bereich) als die Blotentwicklung mit Farbsubstraten. Eine weitere Steigerung der Sensitivität kann durch biotinylierte Antikörper erzielt werden. Dies bedingt jedoch eine längere Entwicklungsprozedur, da zusätzlich mit konjugiertem Streptavidin inkubiert werden muß.

4.8.2 STRIPPEN VON MEMBRANEN

Die Detektion von Proteinen mittels Chemilumineszenzsubstraten ermöglicht die Anfärbung mit mehreren Antikörpern, weil keine ausgefallenen

Reaktionsprodukte entstehen, sondern die Produkte abgewaschen werden können.

Nach der Filmentwicklung werden der 1. und 2. Antikörper mit Glycin/HCl (pH 2,5) entfernt. Dazu wurden die Membranen 5 Min. in TBS gewaschen. Im Anschluß wurde zweimal 15 Min. mit 1 M Glycin/HCl (pH 2,5) gestrippt; zur Neutralisierung wurde danach 10 Min. in 10 mM Tris (pH 7,4) inkubiert. Nach erneutem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen kann der Blot mit einer anderen Antikörperkombination gefärbt werden.

4.8.3 NACHWEIS DER ANTIGEN EXPRESSION IN E.COLI MIT ANTI-HIS-ANTIKÖRPERN

Die Charakterisierung der rekombinanten Expression von pGCRmr Antigen erfolgte über die Coomassie Färbung elektrophoretisch aufgetrennter nichtinduzierter und induzierter Bakterienrohextrakte und der Aufreinigungsprodukte der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (siehe 4.6.5.3).

Anti-His-Antikörper ermöglichen die weitere Charakterisierung und Detektion von 6xHis-Tag Fusionsproteinen im Western Blot.

Das pGCRmr Antigen Fusionsprotein wurde mit einem monoklonalen Maus Anti-His Antikörper von Qiagen nachgewiesen. Diese Antikörper besitzen eine hohe Affinität und Spezifität gegenüber dem 6xHis-Tag. Der Penta-His[®] Antikörper erkennt fünf aufeinanderfolgende Histidinreste unabhängig vom umgebenden Aminosäurekontext (XHHHHHX).

Zur Detektion von His-Tag-Fusionsproteinen wurde der Western blot mit einer Verdünnungsreihe des aufgereinigten und dialysierten pGCRmr-Antigens mit 100 bis 0,39 pg verwendet (siehe 4.6.5.3.3 und 4.6.7). Die Membran wurden direkt nach dem Transfer zweimal 10 Min. in 50 mL TTBS gewaschen. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte über Nacht mit 5 % Blockierungsreagenz (Amersham Pharmacia Biotech). Der Überschuß an Blockierungsreagenz wurde durch dreimaliges Waschen mit 50 mL TTBS entfernt. Die Detektion des His-Tag erfolgte mit dem Penta-His[®] Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 10 mL 1% Blockierungsreagenz. Die Reaktionszeit betrug 1 Std. Im Anschluß folgte ein Waschschrift von dreimal 10 Min. 50 mL TTBS, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der sekundäre AP-konjugierte Antikörper, Ziege Anti-Mouse-Antikörper, wurde in einer Verdünnung von 1:50 000 in 10 mL 1%iger Blockierungsreagenz über 1 Std. eingesetzt. Der anschließende Waschschrift erfolgte wie oben mit 50 mL TTBS, allerdings wurde viermal 10 Min. gewaschen.

Für die Färbereaktion mit CSPD (Boehringer) wurde die Membran in Detektionspuffer 2 Min. equilibriert. Das Substrat wurde 1:100 in Detektionspuffer verdünnt und die Membran damit bedeckt (0,05 mL / cm²). Nach einer Inkubation von 5 Min. wurde die überschüssige Substratlösung mit Whatman Filterpapier

entfernt. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschweißt und zur Verbesserung der Lumineszenzreaktion für 5 Min. bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Es folgte die Fixierung des Blots in der Filmkassette. Die Lichtemission wurde durch das Auflegen des Biolumineszenzfilm (Lumifilm) über einen Zeitraum von 5 Min erfasst.

TTBS (20 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 0,1% Tween (pH 7,4))

10% Blockierungsreagenz

Detektionspuffer (0,1 M Tris, 0,1 M NaCl (pH 9,5))

4.8.4 CHARAKTERISIERUNG DES ANTI-PGCR-IGG

Zur Charakterisierung des Kaninchen Anti-pGCR-Antiserums wurden folgende Fragestellungen (Abbildung 20) geklärt: reagiert das polyklonale Antiserum mit dem

- Antigen
- denaturierten GCR
- nativen ligandengebundenen GCR
- nativen inaktivierten GCR

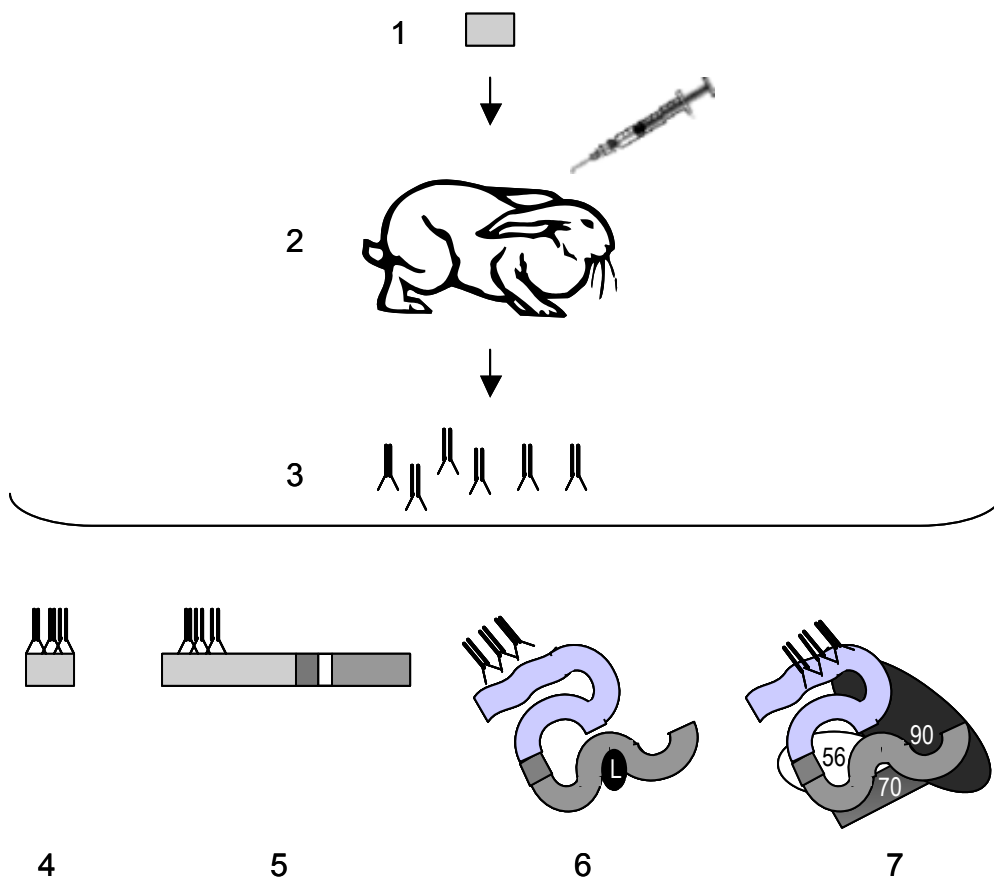


Abbildung 20: Schema zur Charakterisierung des Anti-pGCR-Antiserums
 1) pGCRmr Fragment als Antigen, 2) Immunisierung des Kaninchens, 3) polyklonales Antiserum (IgG Fraktion), 4) AS reagiert mit linearisiertem pGCRmr Antigen (Western blot), 5) AS reagiert mit linearisiertem pGCR (■ TAD, ■ DBD, ■ LBD; Western blot), 6) AS reagiert mit dem nativem ligandengebundenem GCR (Immunpräzipitation), 7) AS reagiert mit nativem nicht aktiviertem GCR (90 = HSP 90, 70 = HSP 70, 56 = HSP 56; Immunpräzipitation)

4.8.4.1 DETEKTION DES pGCRMR-ANTIGENS

Zur Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion und der Bestimmung der Affinität des Anti-pGCR-IgGs wurde der unter 4.8.3 verwendete Western blot, mit der Verdünnungsreihe des pGCRmr Proteins, gestrippt (siehe 4.8.2).

Nach dieser Prozedur wurde einmal mit TTBS gewaschen (50 mL, 10 Min.) und unspezifische Bindungsstellen über Nacht in 5 % Blockierungsreagenz besetzt. Nach dem Waschschrift mit dreimal 50 mL TTBS für 10 Min., wurde eine Anti-pGCR-IgG Verdünnung von 1:2500 in 1 % Blockierungsreagenz (10 mL) gewählt. Die Inkubationszeit betrug 2 h. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Als zweiter Antikörper fand ein monoklonaler Ziege Anti-Rabbit-Antikörper mit HRP-Konjugation in einer Verdünnung von 1:20 000 in 1 % Blockierungsreagent Anwendung bei einer Inkubationszeit von 2 h. Überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für 10 Min. und einmal für 5 Min. in TTBS entfernt. Die Nachweisreaktion erfolgte nach dem ECL Western blotting Reagenz Protokoll von Amersham Pharmacia: Der überschüssige Waschpuffer wurde durch senkrecht Aufstellen der Membran auf ein Filterpapier für ca. 1 Min. entfernt und dann auf einer sauberen Glasplatte positioniert. Ein frisch hergestelltes 1:1 Gemisch aus ECL 1 Reagent und ECL 2 wurde aufgetragen und 1 Min. inkubiert. Dabei wurde pro cm² Membran 0,05 mL ECL-Gemisch verwendet. Danach wurde überschüssiges Reagenz (1 Min.) wieder wie oben beschrieben mittels Filterpapier abgesaugt. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingepackt, sofort in einer Röntgenfilmkassette fixiert und bei absoluter Dunkelheit der Biolumineszenzfilm von Roche (Lumifilm) eingelegt. Die Exposition erfolgte über 15 Sek. Als Negativkontrolle wurde der Blot gestrippt und nach der Blockierungsreaktion über Nacht, mit Präimmenserum in einer Verdünnung von 1:500 in 1% Blockierungslösung inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden, wie oben beschrieben durchgeführt. Der Lumifilm wurde 5 Min. auf die Membran aufgelegt. Als weitere Negativkontrolle wurde die beschriebene Detektionsmethode ohne den ersten Antikörper verwendet.

4.8.4.2 DETEKTION DES DENATURIERTEN pGCR

4.8.4.2.1 SPEZIFIKATION DER ANTIGEN-ANTIKÖRPER-REAKTION

Zur immunologischen Detektion des denaturierten linearisierten pGCR aus Thymuscytosol wurden in drei Spuren eines 8 % SDS-Polyacrylamidgel 15 µL des in SDS-Ladepuffer gelösten NSB-Präzipitates (siehe 4.6.2) aufgetragen, aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose Membran geblottet. Die einzelnen Spuren wurden mit Anti-pGCR-IgG, Anti-pGCR-IgG mit pGCRmr Protein Vorinkubation und Präimmenserum immungefärbt. Dazu wurde der Blot in die Deca-Probe Inkubationskammer eingespannt.

Die Immunfärbung mit Anti-pGCR-IgG wurde prinzipiell wie unter 4.8.4.1 durchgeführt. Es wurde eine Anti-pGCR-IgG Verdünnung von 1:2500 gewählt. Die Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung wurde durch Vorinkubation des Antiserums mit pGCRmr Protein für 30 Min. in Spur 2 und mit Präimmunserum (Verdünnung 1:500) in Spur 3 als Negativkontrolle untermauert. Als zweiter Antikörper fanden in allen drei Spuren monoklonale Anti-Rabbit-Ak mit HRP-Konjugation in einer Verdünnung von 1:20 000 Anwendung. Die Spuren wurden jeweils mit 1 mL Antikörperverdünnung inkubiert, die Wasch- und Absättigungsschritte wurden jeweils mit 15 mL in einer Wanne durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit ECL Western blotting Reagenz (4.8.4.1). Die Lichtemission wurde durch Auflegen des Biolumineszenzfilms über 15 Sek. erfasst.

4.8.4.2.2 OPTIMIERUNG DER ANTIKÖRPERVERDÜNNUNG

Zur weiteren Charakterisierung wurde ein Western Blot, in dem pro Spur 100 µg cytosolisches Protein aus Thymushomogenat aufgetrennt waren, mit verschiedenen Verdünnungen des Anti-pGCR-IgGs gefärbt. Dazu wurde die Membran nach der Absättigungsreaktion mit 5 % Blockierungsreagenz und dem Waschschrift in der Deca-Probe Inkubationskammer fixiert. Die einzelnen Spuren des Blots wurden mit jeweils 1 mL der folgenden in 1% TTBS verdünnten Anti-pGCR-IgG Lösungen inkubiert:

Spur 2	1 : 500
Spur 3	1 : 1 000
Spur 4	1 : 2 000
Spur 5	1 : 4 000
Spur 6	1 : 8 000
Spur 7	1 : 10 000
Spur 8	1 : 16 000
Spur 9	1 : 2 000 + 100 ng pGCRmr

Nach der Reaktion wurde der Blot aus Deca-Probe Inkubationskammer entnommen und dreimal 10 Min. in TTBS gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten HRP-konjugierten Anti-Rabbit-AK (1:20 000) erfolgte wiederum in der Deca-Probe Inkubationskammer mit jeweils 1 mL. Nach dreimaligem Waschen mit 50 mL TTBS für 10 Min. erfolgte die Färbereaktion nach dem ECL Protokoll. Das Chemilumineszenzsignal wurde über 1 Min. detektiert. Dieselbe Detektionsmethode wurde für einen Blot mit jeweils 100 µg cytosolischem Protein aus Colonomogenaten durchgeführt. Weiterhin wurde die Kreuzreaktion eines gegen den humanen Rezeptor gerichteten Peptid-Antiserums getestet. Die Antikörper sind gegen die Aminosäuresequenz AS 245-259 des hGCR gerichtet. Es wurde eine Antikörperverdünnung von 1: 1000 gewählt.

4.8.4.2.3 GCR VERTEILUNG IM DARMTRAKT

Der unter 4.6.7 gefertigte Western Blot mit 100 µg Protein der Cytosol- oder Kernfraktion der Eber und Kastraten wurde wie oben mit Anti-pGCR-IgG und HRP-konjugierten Anti-Rabbit-AK immungefärbt.

Zur Steigerung der Sensitivität der Immunreaktion wurde der Blot nach dem Strippen mit Glycin/HCl mit Anti-pGCR-IgG und biotinyliertem Anti-Rabbit-IgG inkubiert. Die Inkubationszeiten für den ersten und zweiten Antikörper betragen jeweils 2 h. Der biotinylierte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:20 000 eingesetzt. Im Anschluß wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit 50 mL TTBS (10 Min.) für 1 h mit HRP-konjugiertem Streptavidin in einer Verdünnung von 1:4000 in TTBS inkubiert. Der Blot wurde viermal 10 Min. mit 50 mL TTBS gewaschen und nach der Färbereaktion mit ECL 10 Sek. auf dem Biolumineszenzfilm exponiert.

4.8.4.3 DETEKTION DES NATIVEN PGCR - IMMUNPRÄZIPITATION

Die Immunpräzipitation wird mittels Affinitätschromatographie mit Protein-A-Sepharose durchgeführt. Protein A ist ein Protein, das aus der Zellwand von *Saphylococcus aureus* isoliert und bereits 1940 von VERWEY beschrieben wurde. Das Protein besitzt vier hoch homologe affine Bindungsstellen für den Fc-Teil von Immunglobulin G.

Die Versuche zur Immunpräzipitation wurden zur Absicherung der immunhistochemischen Anwendung des Anti-pGCR-As durchgeführt. Die Methode ermöglicht die Prüfung, ob der Rezeptor in seiner nativen, inaktivierten (ohne Dexamethason-Vorinkubation) oder auch in seiner nativen, aktivierten Form (mit Dexamethason-Vorinkubation) vom Antiserum erkannt wird, bzw. ob die Epitope oberflächlich lokalisiert und zugänglich sind (Abbildung 20).

Zur Etablierung der Immunpräzipitation wurde eine NaCl-Optimierung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Präimmunserum eingesetzt und ein Ansatz ohne Antiserum durchgeführt. Als weitere Kontrolle wurde mit 1 µg pGCRmr-Antigen geblockt. Zur Abspaltung der HSPs wurden 1 mg cytosolisches Protein mit 200 nM Dexamethason für 2 Std. bei 4°C im Rotor inkubiert. Der Ansatz zur Immunpräzipitation setzte sich wie folgt zusammen: 1 mg cytosolisches Protein, 1,5 µg Anti-pGCRmr-IgG oder 5 µL Präimmunserum und 40 µL Sepharose A, ad. 500 µL Lysepuffer. Verschiedene Lysepuffer mit NaCl-Konzentration von 0, 50, 100, 150, 200, 250 und 300 mM wurden zur Optimierung getestet. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C im Rotorschüttler inkubiert. Die Präzipitate (1000 rpm, 2 Min., 4°C) wurden dreimal mit 500 µL Lysepuffer gewaschen und in 40 µL 2x SDS-Ladepuffer resuspendiert. 30 µL wurden in

einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend wurde die Membran wie unter 4.8.4.2 beschrieben mit Anti-pGCR-IgG immungefärbt.

4.8.4.4 BIOLUMINESZENZFILMENTWICKLUNG

Die Entwicklung erfolgte in Wannen. Dazu wurde der Film bei absoluter Dunkelheit aus der Kassette entnommen und 5 Min. in das Entwicklerbad gelegt. Nach der Entfernung des Entwicklers durch Spülen des Films in fließendem Wasser erfolgte die Fixierung für 7 bis 10 Min. im Fixiererbad. Anschließend wurde 10 Min. gespült und getrocknet.

4.8.5 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES GCR

4.8.5.1 HERSTELLUNG VON GEWEBSSCHNITTEN

Für die immunhistochemische Färbung wurden 3 µm Gewebsschnitte mit einem Leica Sliding Microtome SM 2000 R angefertigt und zweimal 15 Min. in Chloroform entparaffiniert. In einer absteigenden Alkoholreihe, 100%, 100%, 96%, 70% Ethanol, wurden die Sektionen jeweils mindestens 2 Min. rehydriert und anschließend mit Aqua_{bide}st gespült. Die in 1x Citratpuffer eingelegten Schnitte wurden in der Mikrowelle (1200 W) fünfmal 5 Min. gekocht und 30 Min. bei 4°C abgekühlt. Es folgte eine 5 minütige Inkubation in TBS 2.

10x Citratpuffer (1 M Citronensäuremonohydrat, (pH 6))

10x TBS 2 (25 mM Tris, 150 mM NaCl, (pH 7,4))

4.8.5.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DES GCR

Die nachfolgend beschriebene immunhistochemische Färbung des GCR erfolgte nach einer am Fachgebiet etablierten Methode und wurde von Frau Hägele durchgeführt.

Zur Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte 15 Min. in 2,4% Methanol / Wasserstoffperoxidlösung inkubiert. Anschließend wurde mit Aqua bidest gespült und 5 Min in 1x TBS 2 equilibriert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde der überschüssige Puffer vorsichtig entfernt und der Schnitt mit ca. 100 µL Schafserum 1:10 in 1x TBS 2 bedeckt. Die Inkubation erfolgte über 30 Min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Das Serum wurde behutsam abgeklopft und abgewischt. 100 µL des Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1:1000 in 1x TBS 2 wurden aufgetragen und 60 Min. bei 37°C inkubiert. Die Schnitte wurden in 1x TBS 2 gewaschen, anschließend 5 Min. in 1x TBS 2 inkubiert und die überschüssige Feuchtigkeit vor dem Auftragen des Sekundärantikörper entfernt. Der biotinylierte Schaf Anti-Rabbit-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:400 in 1x TBS eingesetzt. Inkubiert wurde über 30 Min. bei Raumtemperatur. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit TBS. Die Schnitte wurden mit HRP-konjugiertem Streptavidin, verdünnt nach Angaben des Herstellers, über 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes Streptavidin wurde mit 1x TBS entfernt (siehe oben). Als kolorimetrisches Substrat wurde 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) verwendet. Die Entwicklung erfolgte über ca. 10 Sek. und wurde unter dem Mikroskop überprüft. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Spülen in Aqua_{bide}st gestoppt. Die Schnitte wurden in 1x TBS 2 einlegt und mit Hämatoxylin/Eosin gegengefärbt; dafür wurden sie 3 Min. in

filtrierte Hämalaun-Lösung einlegen und anschließend mit fließendem Leitungswasser mindestens 10 Min. gewässert. Es folgt die Einlegung für 5 Min. in 0.2% Eosinlösung und mehrmaliges Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$. Die Schnitte wurden nochmals in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und zweimal 2 Min. in Xylol einlegt.

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität der GCR-Bindung, wurde die Anti-pGCR-Antikörper-Lösung mit verschiedenen Peptiden 1 Std. bei Raumtemperatur und 3 Std. im Eisbad vorinkubiert. Als Peptide wurden IGF-I und Insulin in zehnfachem molarem Überschuss zum Antikörper gewählt. Diese vorinkubierte Peptid-Antikörper-Lösung wurde in einer 1:1000 Verdünnung in 1x TBS eingesetzt. Zusätzlich wurden die Anti-pGCR-Antikörper mit dem pGCRmr Protein vorinkubiert. Als weitere Negativkontrolle wurde die beschriebene Detektionsmethode ohne den ersten Antikörper verwendet.

Methanol/ H_2O_2 -Lösung

250 mL Methanol
6 mL H_2O_2

Substratpuffer (0,2 M

**Citronensäuremonohydrat, 1M Imidazol,
1 M NaCl (pH 7))**

4.2 g Citronensäuremonohydrat
6.8 g Imidazol
5.8 g NaCl
ad 100 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

DAB-Lösung

100 mg DAB
180 mL $\text{Aqua}_{\text{bidest}}$
20 mL Substratpuffer
66.6 μL H_2O_2

Auswertung

Die GCR-Färbung war als braunes Präzipitat sichtbar. Die Auswertung erfolgte im Lichtmikroskop bei einer Objektvergrößerung von 40. Die Darmquerschnitte wurden in folgende mikroskopisch anatomische Regionen untergliedert:

- Lamina propria
 - Zotten
 - Krypten
- Epithelzellen
 - Zotten
 - Krypten

Die Untergliederung und die Auszählfelder sind schematisch für den Dünndarm und den Dickdarm dargestellt (Abbildung 21). Um ein repräsentatives Ergebnis über das Ausmaß der GCR-Färbung zu erhalten, wurden mehrere

Stellen zufällig ausgewählt und zur Evaluierung herangezogen. In den einzelnen Kompartimenten wurden jeweils 500 Zellen ausgezählt.

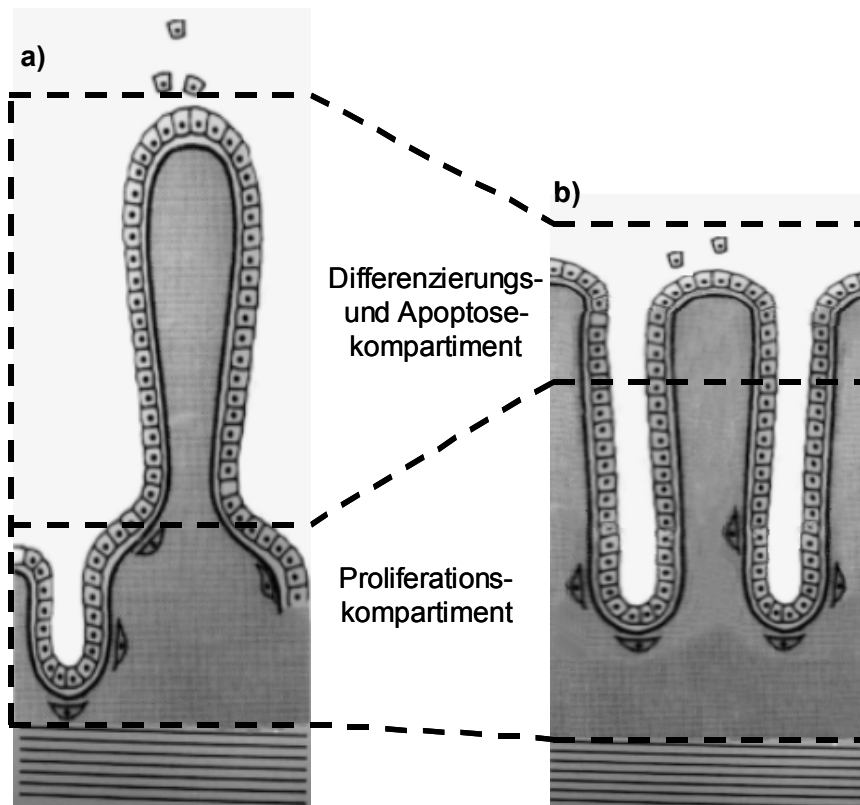


Abbildung 21: Mikroskopisch anatomische Unterteilung des Dünndarms bzw. des Dickdarms und Auszählschema zur Auswertung der GCR-Färbung

5 ERGEBNISSE

5.1 ANALYSE DER cDNA DES PORCINEN GCR (2,1 KB)

5.1.1 RNA ISOLATION UND cDNA-SYNTHESE

Gesamt-RNA wurde mittels Trizol aus porcinem Lebergewebe aufgereinigt. Die RNA-Isolate wiesen durchschnittlich einen Quotienten_{280/280} von 1,5 auf. Die Qualität wurde zudem im denaturierenden Agarosegel kontrolliert (Abbildung 22a). Die RNA zeigt das typische RNA-Bandenmuster, mit einer 28s, 18s und 5s rRNA-Bande. Durchschnittlich lag der Gehalt an Gesamt-RNA bei 3,22 µg/µL. Daraus ergibt sich eine Ausbeute von 322 µg Gesamt-RNA /100 mg Lebergewebe.

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die RT-Reaktion wurde anschließend mittels einer PCR für das *house-keeping* Gen β -Aktin überprüft. In Abbildung 22b) ist bei 400 bp eine starke Bande zu erkennen. Die Positivkontrolle mit genomischer DNA als Matrize ergab wie erwartet ein Amplifikat mit einer Größe von etwa 450 bp. Die Negativkontrolle zeigte keine Banden.

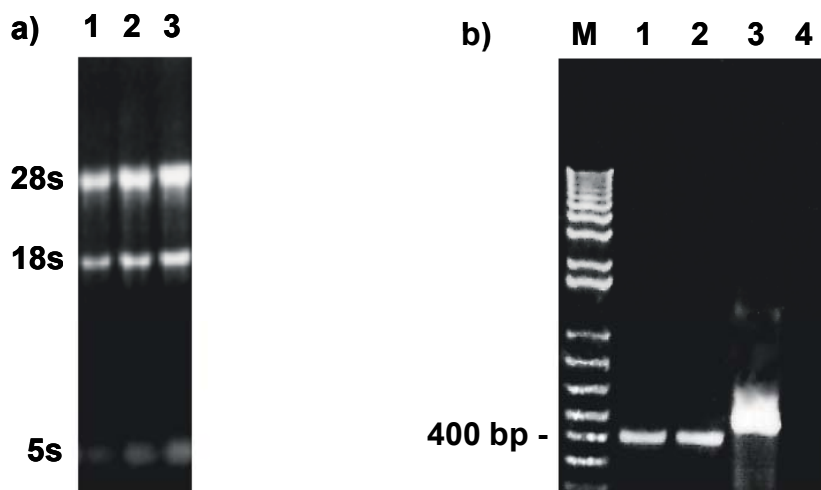


Abbildung 22: RNA-Isolation und cDNA-Synthese

a) Denaturierendes 1,2% Agarosegel mit 10 µg Gesamt-RNA / Spur (1-3)

b) Kontrolle der cDNA-Synthese mittels beta-Aktin-PCR. Spur M: 1 Kb Plus DNA LadderTM, Spur 1: RT-Reaktion 1, Spur 2: RT-Reaktion 2, Spur 3: Positivkontrolle (genomische DNA), Spur 4: Negativkontrolle in 1,2% Agarosegel

5.1.2 AMPLIFIKATION EINES 2,1 KB cDNA-FRAGMENTES DES PORCINEN GCR

Für die Amplifikation eines Fragments des porcinen GCR mit einer voraussichtlichen Größe von 2,1 kb wurde 1 µL der RT-Reaktion eingesetzt. Die PCR wurde mit einem Vorwärtsprimer, der in der Transaktivierungsdomäne (GR1)

und einem Rückwärtsprimer, der in der Ligandenbindungsdomäne (GR2) bindet durchgeführt. Die Strategie zur Amplifikation ist in Abbildung 24 dargestellt. Durch empirische Erhöhung der Annealingtemperatur konnte ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 2,1 kb amplifiziert werden. In Abbildung 23 ist das Ergebnis der Optimierung dargestellt. Bei der höchsten Annealingtemperatur von 56°C entsteht spezifisch ein etwa 2,1 kb Fragment. Bei abnehmender Annealingtemperatur tritt verstärkt eine Schmierbande sowie ein Amplifikat von ca. 1,3 kb auf.

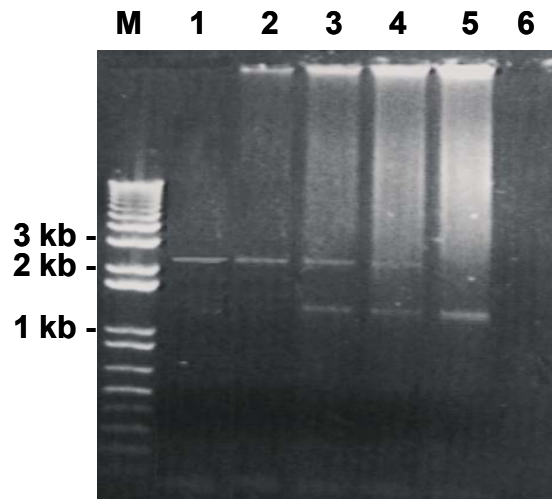


Abbildung 23: Optimierung der PCR

Die PCR wurde bei verschiedenen Annealingtemperaturen zwischen 48 und 56°C durchgeführt. Pro Spur des 0,8% Agarosegels wurden 8 µL der PCR-Reaktion aufgetragen. Spur M: 1 Kb Plus DNA Ladder™, Spur 1: 56°C, Spur 2: 54°C, Spur 3: 52 °C, Spur 4: 50°C, Spur 5: 48°C, Spur 6: Negativkontrolle

Weitere vier PCR-Reaktionen (50 µL Ansätze) wurden zur Vermehrung der *gcr2,1* cDNA bei einer Annealingtemperatur von 56 °C durchgeführt. Das *gcr2,1* PCR-Produkt wurde mit PEG₆₀₀₀ präzipitiert. Das Pellet wurde in H₂O resuspendiert und die Konzentration im Agarosegel bestimmt (13 ng / µL).

5.1.3 KOLONIERUNG DES PGCR2,1 FRAGMENTS IN PGEM-TEASY® UND TRANSFORMATION IN *E. COLI*

Nach der Amplifikation des *gcr2,1* cDNA Fragments wurde eine Tailingreaktion durchgeführt. Die mit Adenosinüberhängen versehene *gcr2,1* cDNA wurde in den pGEM®-Teasy Vektor ligiert. Das entstandene Konstrukt pGEMGCR2,1 (siehe Abbildung 24, oberer Teil) wurde in *E.coli* XL 1 Blue transformiert.

33 weiße Kolonien (Blau-weiß-Selektion) wurden gepickt und in 3 mL „über Nacht“-Kulturen vermehrt. Zuvor wurden die Kolonien mittels PCR-

Screening auf das Tragen des pGEMGCR2,1 Plasmids überprüft, wie beispielhaft im Agarosegel (Abbildung 25) dargestellt. Bei einem gewählten Vektor-Insert Verhältnis von 1:1 im Ligationsansatz enthielten 8 Klone (24%) das pGEMGCR2,1 Plasmid.

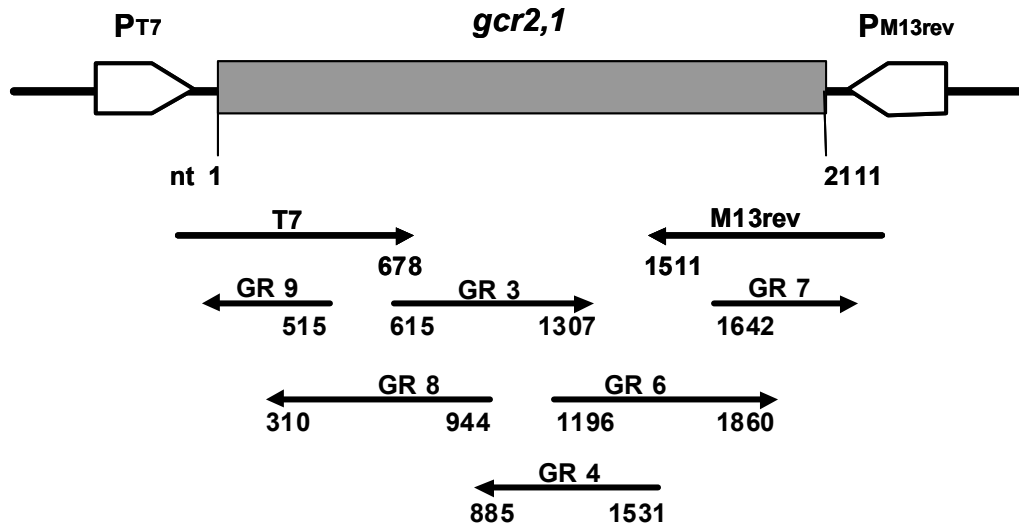


Abbildung 24: pGEMGCR2,1 Konstrukt und Sequenzierstrategie
 Der pGEM[®]-Teasy Vector mit den T7 und M13rev RNA-Polymerase Promotoren (P_{T7} , P_{M13rev}) enthält 2,1 kb des porcinen GCR (*gcr2,1*) als Insert (oberer Teil). Die horizontalen Pfeile unterhalb, zeigen die Richtung und die Anzahl der sequenzierten Basen mit den Primern T7, GR3, GR4 und M13rev

Die Klone der Spuren 1, 2, 8, 11, 12 und 13 zeigten ein Amplifikat mit einer Größe von 2,1 kb. Die Spuren 3, 4, 5, 6 und 10 zeigen Amplifikate von 250 bp und 350 bp auf. In Spur 7 erfolgte keine Amplifikation.

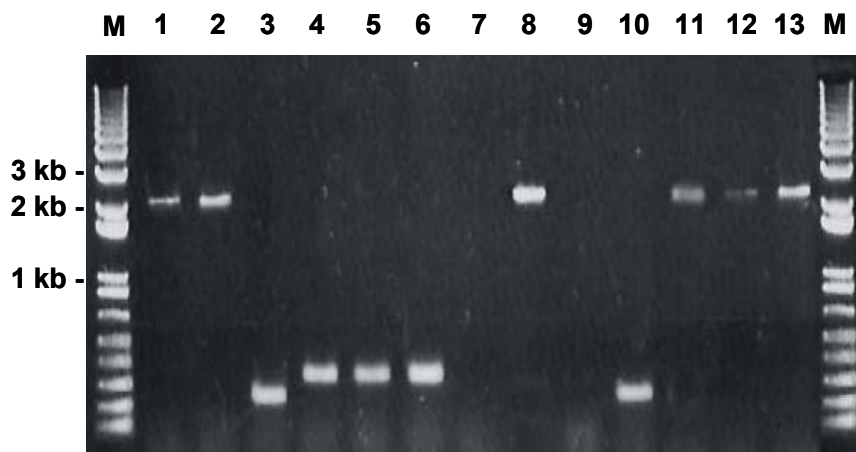


Abbildung 25: PCR-Screening auf pGEMGCR2,1 Klone
 Spur M: 1 Kb Plus DNA Ladder[™], Spur 1+2+8+11+12+13: pGEMGCR2,1 Klone, Spur 3-7+10: Klone ohne das pGEMGCR2,1 Plasmid, Spur 9: Negativkontrolle in 0,8% Agarosegel, pro Spur wurden 9 μ L PCR-Ansatz aufgetragen.

5.1.4 PLASMIDISOLATION

Aus fünf „über-Nacht“-Kulturen der pGEMGCR2,1 tragenden *E.coli* XL 1 Blue Bakterien (A-E) wurden die Plasmide mittels Minipräparation isoliert und in 20 μL Aqua_{bidest} gelöst.

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die Plasmidisolat 1:50 in Aqua bidest verdünnt. Das Isolat des Klon A enthielt 1440 ng / μL , des Klon B 912,5 ng / μL , des Klon C 1550 ng / μL , des Klon D 348 ng / μL und des Klon E 420 ng / μL . Das pGEMGCR2,1 Plasmid besitzt eine Größe von etwa 5,1 kb. Das Agarosegel in Abbildung 26 zeigt eine starke Bande des superhelikalen Plasmids bei etwa 6 kb und eine schwache Bande des helikalen Plasmids bei >10 kb. Weiterhin ist erkennbar, dass keine RNA Kontamination vorliegt.

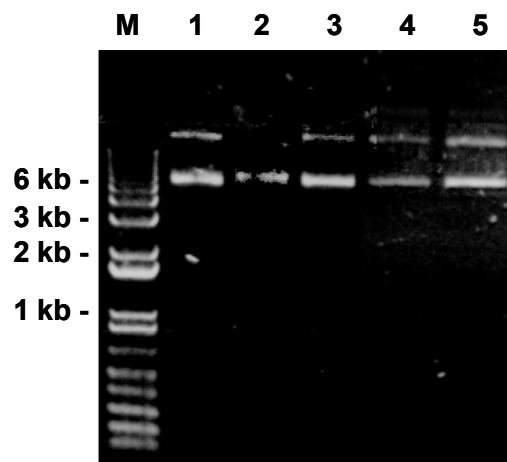


Abbildung 26: pGEMGCR2,1 Plasmidisolat

Spur M: 1 Kb Plus DNA Ladder™, Spur 1: pGEMGCR2,1 Klon A, Spur 2: pGEMGCR2,1 Klon B, Spur 3: pGEMGCR2,1 Klon C, Spur 4: pGEMGCR2,1 Klon D, Spur 5: pGEMGCR2,1 Klon E in 0,8%igem Agarosegel. In Spur 1-3 wurden 3 μL und in Spur 4 und 5 10 μL einer 1:50 Verdünnung der Plasmidisolat aufgetragen.

5.1.5 SEQUENZANALYSE

5.1.5.1 SEQUENZIERKONSTRUKT UND STRATEGIE

Das Konstrukt pGEMGCR2,1 und die Sequenzierstrategie sind in Abbildung 24 schematisch dargestellt. Mit den Primern T7 und M13rev konnten durchschnittlich 678 bzw. 600 bp eingelesen werden. Aus diesen sequenzierten Bereichen wurden die 17-mer DNA Oligonukleotide GR3 und GR4 generiert. Damit wurden durchschnittlich 692 bzw. 646 Nukleotide sequenziert. Zur Doppelstrang-Analyse wurden weitere Sequenzierprimer eingesetzt (GR6, GR7, GR8, GR9).

5.1.5.2 NUKLEOTIDSEQUENZ UND ABGELEITETE AMINOSÄURENSEQUENZ DES PORCINEN GCR (2,1 KB)

Die fünf isolierten Klone A-E wurden jeweils zweimal sequenziert. Die 2111 bp umfassende Konsensusnukleotidsequenz des porcinen GCR ist in Abbildung 27 dargestellt, wobei die Nukleotide (nt) in 5'-3'-Richtung nummeriert sind. Die *gcr2,1* cDNA kodiert für 703 Aminosäuren (as).

```

as      1 Val Ser Ala Ser Ser Pro Ser Leu Ala Ala Val Ser Gln Pro Asp Ser Lys Gln Gln Arg
nt      1 g t t t c t g c g t c t t c a c c c t c c c t g g c t g c t g t g t c t c a g c c a g a c t c c a a g c a g c a g a g g

21 Leu Ala Val Asp Phe Pro Lys Gly Ser Gly Ser Asn Ala Gln Gln Pro Asp Leu Ser Lys
61 c t t g c g g t g g a c t t t c c a a a a g g c t c a g g a a g c a a t g c a c a g c a g c c a g a t c t g t c c a a g

41 Ala Val Ser Leu Ser Met Gly Leu Tyr Met Gly Glu Thr Glu Thr Lys Val Met Gly Ser
121 g c a g t t t c a c t c t c c a t g g g a c t g t a c a t g g g a g a g a c c g a a a c t a a a g t g a t g g g a a g t

61 Asp Leu Gly Phe Pro Gln Gln Gly Gln Ile Ser Leu Ser Ser Gly Glu Thr Asp Phe Arg
181 g a c c t g g g a t t c c c a c a g c a g g g c c a a a t c a g c c t t t c c t c t g g g g a g a c a g a c t t c c g g

81 Leu Leu Glu Glu Ser Ile Ala Asn Leu Ser Arg Ser Thr Ser Val Pro Glu Asn Pro Lys
241 c t t c t g g a a g a a a g c a t c g c a a a c c t c a g t a g g t c g a c c a g t g t t c c a g a g a a c c c c a a g

101 Ser Ser Ala Ser Ala Ala Gly Pro Ala Ala Pro Ala Glu Lys Ala Phe Pro Lys Thr His
301 a g t t c a g c c t c c g c t g c t g g t c c t g c t g c t c c g g c a g a g a g g c g t t t c c a a a a a c c c a c

121 Ser Asp Gly Ala Pro Glu Gln Pro Asn Val Lys Gly Gln Thr Gly Thr Asn Gly Gly Asn
361 t c t g a t g g g g c t c c a g a g c a g c c g a a t g t g a a g g g t c a g a c t g g c a c c a a c g g g g g t a a c

141 Val Lys Leu Phe Thr Thr Asp Gln Ser Thr Phe Asp Ile Trp Arg Lys Lys Leu Gln Asp
421 g t g a a g t t g t t t a c c a c a g a c c a a a g c a c c t t t g a c a t t t g g a g g a a g a a a c t c c a g a t

161 Leu Glu Leu Pro Ser Gly Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Glu Ser Pro Trp Ser Ser Asp
481 t t g g a g c t t c c t t c t g g g t c t c c a g g t a a a g a g a c a a g t g a g a g t c c c t g g a g c t c g g a c

181 Leu Leu Ile Asp Glu Asn Cys Leu Leu Ser Pro Leu Ala Gly Glu Glu Asp Pro Phe Leu
541 c t c t g a t c g a t g a a a a c t g t t t g c t c t c c c c t t t g g c a g g a g a g g a g g a t c c c t t c c t c

201 Leu Glu Gly Ser Ser Thr Glu Asp Cys Lys Pro Leu Val Leu Pro Asp Thr Lys Pro Lys
601 t t g g a a g g a a g c t c g a c c g a g g a c t g t a a g c c t c t t g t t t t g c c g g a c a c g a a a c c t a a a

```

as 221 Val Lys AspAsn Gly Glu Leu Ile Leu Pro Ser Pro Asn Ser Val Pro Leu Pro Gln Val
nt 661 gtgaaggataacggagagcttatcttaccgagccccaacagtgtgccactgccccaagt

241 Lys Thr Glu Lys Glu AspPhe Ile Glu Leu Cys Thr Pro Gly Val Ile Lys Gln Glu Lys
721 aaaacagaaaaagaagattttatcgaactctgcaccccaggggtgat taagcaggagaaa

261 Leu Gly Pro Ala Tyr Cys Gln Ala Ser Phe Ser Gly Ala Asn Ile Ile Gly Gly Lys Met
781 ctgggcccagcctactgtcaggcgagctttctggggcaaacataattgggtggtaaaa

281 Ser Ala Ile Ser Val His Gly Val Ser Thr Ser Gly Gly Gln Leu Tyr His Tyr AspMet
841 tctgccatttctgttcacggggtgagcaccctcgggggacagctgtaccactatgacatg

301 Asn Thr Ala Ala Ser Leu Ser Lys Gln Gln Glu Gln Lys Pro Leu PheAsn Val Ile Pro
901 aacacggcagcatccctttccaaacagcaggagcagaaacctctttttaagtcat tccc

321 Pro Ile Pro Val Gly Ser Glu Asn Trp Asn Arg Cys Gln Gly Ser Gly AspAspAsn Leu
961 ccgattccctgtgggttcagaaaattggaatagatgccaaaggatctggagacgataactgt

341 Thr Ser Leu Gly Thr Leu AsnPhe Ser Gly Arg Ser Val Phe Ser Asn Gly Tyr Ser Ser
1021 acttccctggggactttgaacttctctggccgatacgttttttcgaaatggctactcaagc

361 Pro Gly Met Arg Pro Asp Val Ser Ser Pro Pro Ser Ser Ser Ala Ala Thr Gly Pro
1081 cctggaatgagaccggacgtaagtcttccctccatcgagctcctcagcagcaacgggacca

381 Pro Pro Lys Leu Cys Leu Val Cys Ser Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Val Leu
1141 cctcccaaactctgccctgtgtgttctgatgaagcttcgggatgtcat ta tggggctcctg

401 Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val PhePheLys Arg Ala Val Glu Gly Gln His Asn Tyr Leu
1201 acttgtggaagctgtaaagtattcttcaaaagagcagtggaaggacagcacaattatctt

421 Cys Ala Gly Arg AsnAspCys Ile Ile Asp Lys Ile Arg Arg Lys AsnCys Pro Ala Cys
1261 tgtgctggaagaaa tgactgtatcat tgataaaaat tcaagaaaaaac tgtccagcatgc

441 Arg Tyr Arg Lys Cys Leu Gln Ala Gly MetAsn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys Lys Lys
1321 cgctacagaaagtgtcttcaagctggaaatgaacctggaagctcgaaaaacaagaaaaag

461 Ile Lys Gly Ile Gln Gln Ala Thr Thr Gly Val Ser Gln Glu Thr Ser Glu Asn Ser Ala
1381 ataaaaggaattcagcaggccactacaggagctcacaagaaacttctgaaaa tctgct

as 481 Asn Lys Thr Ile Val Pro Ala Thr Leu Pro Gln Leu Thr Pro Thr Leu Val Ser Leu Leu
nt 1441 aa taaaacaatagttcctgcaacgctaccacagctcacccccaccc tgggtgtcactgctg

501 Glu Val Ile Glu Pro Glu Val Leu Tyr Ala Gly Tyr Asp Ser Ser Ile Pro Asp Ser Thr
1501 gaagtcat tgaacccgagg tgtgtatgcaggat atgacagctcgat tccagat tccacc

521 Trp Arg Ile Met Thr Ala Leu Asn Met Leu Gly Gly Arg Gln Val Ile Ala Ala Val Lys
1561 tggcggatcatgaccgcactcaacatgttaggcgggcggcagg tgat tgcagcagtgaaa

541 Trp Ala Lys Ala Ile Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Leu Asp Asp Gln Met Thr Leu Leu
1621 tgggcaaaggcaat accagga ttcaggaact tacacc tggat gaccaa atgaccc tcc t g

561 Gln Tyr Ser Trp Met Phe Leu Met Val Phe Ala Leu Gly Trp Arg Ser Tyr Arg Gln Ser
1681 cagtat tcatggatgt t t c t c a t g g t g t t c g c c c t g g g g t g g a g a t c a t a c a g a c a a t c a

581 Ser Ala Ser Leu Leu Cys Phe Ala Pro Asp Leu Val Ile Asn Glu Gln Arg Met Ala Leu
1741 agtgccagct tgc t g t g t t t t g c t c c t g a t c t g g t t a t t a a t g a g c a g a g a a t g g c t t t a

601 Pro Cys Met Tyr Asp Gln Cys Arg His Met Leu Tyr Val Ser Ser Glu Leu Gln Arg Leu
1801 ccc t g c a t g t a t g a c c a a t g t a g a c a t a t g c t g t a t g t t t c c t c t g a g t t a c a g a g g c t t

621 Gln Val Ser Tyr Glu Glu Tyr Leu Cys Met Lys Thr Leu Leu Leu Leu Ser Ser Val Pro
1861 cagg t g t c t t a c g a a g a g t a t c t c t g t a t g a a a a c c t t a c t g c t t c t c t c t t c a g t t c c c

641 Lys Asp Gly Leu Lys Ser Gln Glu Leu Phe Asp Glu Ile Arg Met Thr Tyr Ile Lys Glu
1921 aaggacgg t t t g a a g a g t c a a g a g c t a t t t g a t g a a a t t a g a a t g a c c t a c a t c a a a g a g

661 Leu Gly Lys Ala Ile Val Lys Arg Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Trp Gln Arg Phe Tyr
1981 c t a g g a a a g c c a t t g t c a a g a g g g a a g g a a a c t c c a g t c a g a a c t g g c a a c g c t t t t a t

681 Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Met His Asp Val Val Glu Asn Leu Leu Asn Tyr Cys
2041 caac t g a c a a a a c t c t t g g a c t c c a t g c a t g a t g t g g t t g a a a a t c t c c t t a a c t a t t g c

701 Phe Gln Thr 703
2101 t t c c a g a c a t t 2111

Abbildung 27: 2,111 kb Konsensusnukleotidsequenz (nt) und resultierende Aminosäuresequenz (as) des porcinen GCR

Die 5 sequenzierten pGEMGCR2,1 Klone (A-E) unterscheiden sich untereinander in insgesamt 22 Basen. In Tabelle 6 sind die Unterschiede der Nukleotidsequenz und die Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz zusammengefasst.

Tabelle 6: Abweichungen der Klone A bis E von der Konsensussequenz

Klon	Nukleotid			⇒	Aminosäure		
	Position	Klon	Konsensus		Klon	Konsensus	Position
A	398	G	A	⇒	Arg	Gln	133
	537	A	G	⇒	-	Ser	179
	731	G	A	⇒	Arg	Lys	244
	799	T	C	⇒	End	Gln	267
	1606	T	-	⇒	frame shift	-	-
	1611	G	A	⇒	-	Ala	537
	1706	G	T	⇒	Gly	Val	569
B	523	G	A	⇒	Cys	Ser	175
	1116	A	G	⇒	-	Ser	373
	1417	T	C	⇒	End	Gln	473
	1918	G	C	⇒	Ala	Pro	640
	2067	A	G	⇒	Ile	Met	689
C	495	C	T	⇒	-	Ser	165
	1140	G	A	⇒	-	Pro	380
	1796	T	C	⇒	Val	Ala	599
	1797	A	T	⇒	-	Ala	599
D	31	A	G	⇒	Met	Val	11
	58	A	G	⇒	-	Gln	19
	336	G	A	⇒	-	Ala	112
E	281	C	G	⇒	Thr	Ser	94
	310	A	T	⇒	Asn	Ser	104
	322	T	C	⇒	Ser	Pro	108
	596	T	-	⇒	frame shift	-	-
	1497	T	G	⇒	-	Leu	499

9 Nukleotidaustausche bleiben neutral, d.h. das Codon wird in ein synonymes Codon umgewandelt. 13 Nukleotidaustausche führen zu einer Änderung der genetischen Information und damit des Genproduktes. Klon pGEMGCR2,1(A) und (B) zeigen etliche Transitionen auf und enthalten "nonsense"-Mutationen; es sind im Vergleich zur Konsensussequenz zwei Stoppcodons $t^{799}ag$ bzw. $t^{1417}aa$ eingefügt, welche zur Synthese unvollständiger Proteinfragmente führen. Klon pGEMGCR2,1(A) und pGEMGCR2,1(E) weisen Insertationen an Position nt 1606 bzw. Position nt 596 auf. Das Leseraster wird verändert; es kommt zu einer Verschiebung des Leserahmens. Klon pGEMGCR2,1(C) unterscheidet sich vom Konsensus durch eine neutrale Transversion und Klon pGEMGCR2,1(D) durch 3 Transitionen (2 neutrale).

5.1.5.2.1 SPEZIESVERGLEICH DES GCR AUF NT-EBENE

Insgesamt ist die porcine Konsensusnukleotidsequenz zu etwa 89% mit der des humanen Rezeptors (HOLLENBERGER et al., 1986) identisch.

Zwischen den Spezies weist die modulatorische Region die deutlichsten Unterschiede auf, mit der humanen Sequenz weist die porcine eine Übereinstimmung von 88% auf. Zudem enthält diese Region einen Einschub von 12 Nukleotiden (nt 461-474). Die DNA-Bindungsdomäne und die Hingeregion weisen eine hohe Homologie von 90% bzw. 94% auf. Die Nukleotidsequenz der Ligandenbindungsdomäne unterscheidet sich zu 9%. Der Homologievergleich auf Nukleotidebene ist in Abbildung 28 schematisch dargestellt.

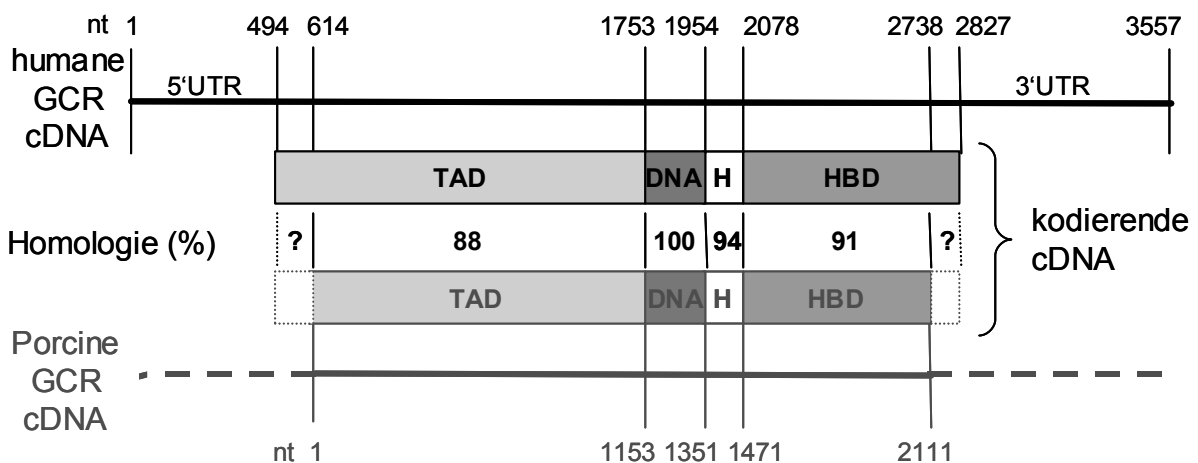


Abbildung 28: Humane und porcine Nukleotidsequenz des GCR

Kodierende Regionen für die Domänen (TAD = Transaktivierungsdomäne, DNA = DNA-Bindungsdomäne, H = Hingedomäne, HBD = Hormonbindungsdomäne) und Speziesunterschiede innerhalb der Domänen. 5'- und 3'-UTR bzw. N- und C-terminales Ende des pGCR wurden nicht sequenziert - - -.

Die Nuklotide nt 494 bis 1753 kodieren für die Transaktivierungsdomäne des hGCR, beim Schwein sind 1153 Nukleotide sequenziert. Die DNA-Bindungsdomäne wird beim Menschen von den Nukleotiden 1754-1954 und beim Schwein von nt 1153-1351, die Hingedomäne von nt 1954-2079 bzw. 1351-1471 kodiert. Die Hormonbindungsdomäne umfasst beim humanen Rezeptor 849 Nukleotide, beim Schwein sind bislang 639 Basen bekannt.

5.1.5.2.2 SPEZIESVERGLEICH DES GCR AUF AS-EBENE

Insgesamt unterscheidet sich die porcine Sequenz in 204 Codons von der humanen, jedoch führen nur 63 (30 %) zu einer Änderung der Aminosäure.

Abbildung 28 zeigt die aus der Konsensusnukleotidsequenz hervorgehende Aminosäuresequenz des porcinen GCR im Vergleich zu den Sequenzen der Spezies *Homo sapiens*, *Saginus oedipus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Ovis aries* und *Cavia porcellus*. Der humane GCR umfaßt 777 Aminosäuren. 703 As des porcinen Rezeptor sind bekannt. Die bekannte Aminosäuresequenz des Schafes umfaßt 314 Aminosäuren. Die Rezeptoren der restlichen Spezies sind vollständig sequenziert und umfassen zwischen 771 und 795 Aminosäuren. Daraus kann geschlossen werden, dass ca. 40 Aminosäuren des N-terminalen und etwa 74 Aminosäuren des C-terminalen Endes nicht sequenziert sind.

Eine Vielzahl an ausgetauschten Aminosäuren konnte in der modulatorischen Region festgestellt werden; sie zeigt die geringste Identität zum humanen Rezeptor mit ca. 85%. Bei 44% der Aminosäuren handelt es sich um einen neutralen Austausch, während in 56% Aminosäuren mit anderen chemischen Eigenschaften ausgetauscht wurden. An der Aminosäureposition 154 der porcinen Sequenz sind 4 Aminosäuren (WRRK) und an Position 303 eine Aminosäure insertiert. Die Deletion einer Aminosäure wurde an Position 376 festgestellt.

Ergebnisse

Species	→ Modulatorische Region	
<i>Homo sapiens</i>	MDSKESLTP*GREENPSSVLAQERGDVMDFYKTLRGGATVKVVSASSPSLAVASQSDSKQR	59
<i>Sus scrofa</i>AV--P----	19
<i>Saguinus oedipus</i>* - K -T - - - N - - - C - I -L - - - V - - T - -	59
<i>Rattus norvegicus</i>A - P - - D - V - G - L - GQG - - S - - - L - - S -V - - - A - - -	60
<i>Mus musculus</i>A - P - - D - V - - L - GRG - - S - - - L -ATV - - - V - - - A - - -	60
<i>Ovis aries</i>	
<i>Cavia porcellus</i>	- - L - - - V - S * SK - V * - - - - GS - - RN - I - - - - V -A - - - - R	58
<i>Homo sapiens</i>	RLLVDFPKGSVSNAAQQ*****PDLKAVSLSMGLYMGETETKVMG	99
<i>Sus scrofa</i>	- - A - - - - - G - - - - *****	59
<i>Saguinus oedipus</i>	- - A - - - - - *****	99
<i>Rattus norvegicus</i>	- - L - - S - - - T - - V - - RQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ - - - - -	120
<i>Mus musculus</i>	- - L - - S - - - A - - - - QQQQQQPQ*****	108
<i>Ovis aries</i>	
<i>Cavia porcellus</i>*****	98
<i>Homo sapiens</i>	NDLGFPQQGQISLSSGETDLKLLLEESIANLNRSTVSPENPKSSASTAVSAAAPTEKEFPKT	159
<i>Sus scrofa</i>	S - - - - - FR - - - - - S - - - - - A - GP - - - A - A - - -	119
<i>Saguinus oedipus</i>Q - - - - - SS - - - - - K - - - - -	159
<i>Rattus norvegicus</i>Y - - - - - LG -T - - T - C - T - - - - -	180
<i>Mus musculus</i>Y - - - - - LG -R - - - - - TP - - - C - T - - - - - Q -	168
<i>Ovis aries</i>	17
<i>Cavia porcellus</i>P -N - - - VSGTPTE - * * - - -	156
<i>Homo sapiens</i>	HSDVSSEQQHLKGQTGTNGGNVKLYTTDQSTFDI****LQDLEFSSGSPGKETNESPWRS	215
<i>Sus scrofa</i>	- - - GAP - - PNV - - - - - F - - - - - WRKK - - - - - LP - - - - - S - - - - S -	179
<i>Saguinus oedipus</i>A - C - A -****	215
<i>Rattus norvegicus</i>A - - - - - R - S - - - - - S - - - - - P - - - - - L **** - K - - - - - A - - - - - D - - - - -	236
<i>Mus musculus</i>P - - - - - R - S - P - - - - - S -****	224
<i>Ovis aries</i>K - S - - SM - H -E - S - - - D - - - -	77
<i>Cavia porcellus</i>	Q - - L - - - - - S - A - - - - - * - PP - - - - - **** - K - - - - - R - - - - - P	211
<i>Homo sapiens</i>	DLLIDENCLLSPLAGEDDSFLLEGNSNEDCKPLILPDTKPKIKDNGDLVLSPPSNVTLQP	275
<i>Sus scrofa</i>E - P - - - - - S - T - - - - - V - - - - - V - - - - - E - I - P - - NS - P - - -	239
<i>Saguinus oedipus</i>S - - - - -	275
<i>Rattus norvegicus</i>* -DT -T - - T - - - - - A - - -	295
<i>Mus musculus</i>* -DV -Q - T - - T - - - - - A - - -	283
<i>Ovis aries</i>	- -L - - - A -G - - - S - - - Q - -	137
<i>Cavia porcellus</i>	- - M - - S -G - - - S - - - Q - -	271
<i>Homo sapiens</i>	VKTEKEDFIELCTPGVIKQEKLGTVYQCASFPGANIIGNKMSAISVHGVSTSGGQMYHYD	335
<i>Sus scrofa</i>PA - - - - - S - - - - - G - - - - - L - - - -	299
<i>Saguinus oedipus</i>S -I - - - - -	335
<i>Rattus norvegicus</i>D -T - - - - -	355
<i>Mus musculus</i>D -T - - - - -	343
<i>Ovis aries</i>	197
<i>Cavia porcellus</i>	- - M - - - - -	331
<i>Homo sapiens</i>	MNTA*SLSQQQDQKPIFNVIPPIPVGSEWNRCQSGDDNLTSLGTLNFPGRTVFSNGYS	394
<i>Sus scrofa</i>	- - - A - - - K - - E - - - L -S - - S - - - - -	359
<i>Saguinus oedipus</i>*	394
<i>Rattus norvegicus</i>* -V -E - S - - - - A - - - - -	414
<i>Mus musculus</i>* -V -E -AM - - A - - - - -	402
<i>Ovis aries</i>* -K -S - - - - -	256
<i>Cavia porcellus</i>* -E -V - - - - -	390

Species ← → DNA-Bindungsregion

<i>Homo sapiens</i>	S P S M R P D V S S P P S S S S T A T T G P P P K L C L V C S D E A S G C H Y G V L T C G S C K V F F K R A V E G Q H N	454
<i>Sus scrofa</i>	- - G - - - - - - - - - - * - A -	418
<i>Saguinus oedipus</i>	- -	454
<i>Rattus norvegicus</i>	- -	473
<i>Mus musculus</i>	- -	461
<i>Ovis aries</i>	- -	314
<i>Cavia porcellus</i>	- - - L - - - - - - - - - - * T -	449

← → Hinge Region

<i>Homo sapiens</i>	Y L C A G R N D C I I D K I R R K N C P A C R Y R K C L Q A G M N L E A R K T K K K I K G I Q Q A T T G V S Q E T S E N	514
<i>Sus scrofa</i>	- -	478
<i>Saguinus oedipus</i>	- -	514
<i>Rattus norvegicus</i>	- -	533
<i>Mus musculus</i>	- -	521
<i>Ovis aries</i>	- -	.
<i>Cavia porcellus</i>	- -	509

← → Hormon-Bindungsregion

<i>Homo sapiens</i>	P G N K T I V P A T L P Q L T P T L V S L L E V I E P E V L Y A G Y D S S V P D S T W R I M T T L N M L G G R Q V I A A	574
<i>Sus scrofa</i>	S A -	538
<i>Saguinus oedipus</i>	- -	574
<i>Rattus norvegicus</i>	- * - - - - - A -	592
<i>Mus musculus</i>	* - - - - - A -	580
<i>Ovis aries</i>	- -	.
<i>Cavia porcellus</i>	- * - - - - - - - - - - - I H S - - - - T S -	568

<i>Homo sapiens</i>	V K W A K A I P G F R N L H L D D Q M T L L Q Y S W M F L M A F A L G W R S Y R Q S S A N L L C F A P D L I I N E Q R M	634
<i>Sus scrofa</i>	- -	598
<i>Saguinus oedipus</i>	- -	634
<i>Rattus norvegicus</i>	- - - - - - - - - - - L -	652
<i>Mus musculus</i>	- -	640
<i>Ovis aries</i>	- -	.
<i>Cavia porcellus</i>	- - - - - - - - - - - K -	628

<i>Homo sapiens</i>	T L P C M Y D Q C K H M L Y V S S E L H R L Q V S Y E E Y L C M K T L L L L S S V P K D G L K S Q E L F D E I R M T Y I	694
<i>Sus scrofa</i>	A - - - - - - - - R - - - - - - - - Q -	658
<i>Saguinus oedipus</i>	- -	694
<i>Rattus norvegicus</i>	S - - - - - - - - - - F -	712
<i>Mus musculus</i>	- - - - - - - - - - - - - - - - - - F I - T -	700
<i>Ovis aries</i>	- -	.
<i>Cavia porcellus</i>	S - - W - - - - - - Y - - - - - - - - K -	688

<i>Homo sapiens</i>	K E L G K A I V K R E G N S S Q N W Q R F Y Q L T K L L D S M H E V V E N L L N Y C F Q T F L D K T M S I E F P E M L A	754
<i>Sus scrofa</i>	- -	703
<i>Saguinus oedipus</i>	- -	754
<i>Rattus norvegicus</i>	- -	772
<i>Mus musculus</i>	- -	760
<i>Ovis aries</i>	- -	.
<i>Cavia porcellus</i>	- -	748

←

<i>Homo sapiens</i>	E I I T N Q I P K Y S N G N I K K L L F H Q K	777
<i>Sus scrofa</i>	- -	.
<i>Saguinus oedipus</i>	- - - - - L -	777
<i>Rattus norvegicus</i>	- -	795
<i>Mus musculus</i>	- -	783
<i>Ovis aries</i>	- -	.
<i>Cavia porcellus</i>	- - - - - L - - - - - D -	771

Abbildung 29: Vergleich der GCR Aminosäuresequenz von *Homo sapiens*, *Sus scrofa*, *Saginus oedipus*, *Rattus norvegicus*, *Ovis aries* und *Cavia porcellus*. Die Bindestriche “-“ deuten identische Aminosäuren verglichen mit der humanen Sequenz an. Fehlende Aminosäuren wurden durch einen Stern „*“ angezeigt und nicht sequenzierte unbekannte Bereiche sind durch Leerzeichen gekennzeichnet. Der Beginn und das Ende der Transaktivierungs-, DNA-Bindungs-, Hinge- und Hormonbindungsdomäne sind durch die verschiedenen Pfeile markiert. Die für die Antigen synthese ausgewählte Region (pGCRmr) ist grau unterlegt.

Die DNA-Bindungsdomäne mit 100% und die Hingeregion mit 95% sind vollständig bzw. hoch konserviert. Die Ligandenbindungsdomäne stimmt mit der humanen zu etwa 95% überein. 9 aa sind hier ausgetauscht, davon sind 5 konservativ (Val⁵⁵² zu Ile⁵¹⁶, Asn⁶¹⁹ zu Ser⁵⁸³, Ile⁶²⁸ zu Val⁵⁹², Lys⁵⁴⁴ zu Arg⁶⁰⁸, Glu⁷²⁷ zu Asp⁶⁹¹). Bei der Substitution von Thr⁶³⁵ zu Ala⁵⁹⁹, Ala⁶⁰⁵ durch Val⁵⁶⁹ wird eine unverzweigte gegen eine verzweigte Aminosäure ausgetauscht. Wird His⁶⁵⁴ gegen Gln⁶¹⁸ ausgetauscht, handelt es sich um den Austausch einer basischen Aminosäure gegen eine nichtpolarisierte, aber polare Aminosäure. Tabelle 7 zeigt eine Zusammenfassung des Vergleiches oben genannter Spezies. Dabei steht die erste Zahl für Übereinstimmung, die zweite für die Übereinstimmung unter Berücksichtigung eines neutralen Aminosäureaustausches und die dritte Zahl bezieht sich auf die Anzahl der Lücken. Alle Angaben sind in %.

Tabelle 7: Homologievergleich (in %) auf Aminosäureebene verschiedener Säugetiere

		Homo sapiens	Sus Scrofa	Saginus oedipus	Rattus norvegicus	Mus musculus	Ovis aries	Cavia porcellus	
T A D	H. sapiens	100	100	100	100	100	100	100	D N A
	S. scrofa	85-90-1	100	100	100	100	100	100	
	S. oedipus	94-96-1	84-89-1	100	100	100	100	100	
	R. norv.	81-86-5	78-84-6	79-86-5	100	100	100	100	
	M. mus.	84-89-2	80-86-3	81-87-1	92-94-2	100	100	100	
	O. aries	88-93-1	86-91	86-91-1	84-89-1	84-90-1	100	100	
	C. porc.	86-91-1	83-88-2	84-89-1	78-85-5	80-87-3	82-87-3	100	
H I N G E	H. sapiens	100	95-97	98-99	96-97	95-98	-	90-97	L B D
	S. scrofa	95-95	100	94-97	93-96	92-96	-	89-96	
	S. oedipus	97-97	97-97	100	95-97	94-97	-	90-97	
	R. norv.	90-92-2	87-89-2	90-92-2	100	96-98	-	90-97	
	M. mus.	87-89-2	90-92-2	90-92-2	97-97	100	-	87-97	
	O. aries	-	-	-	-	-	-	-	
	C. porc.	92-94-2	90-92-2	95-95-2	89-94	87-92	-	100	

Die Homologie des Glucocorticoidrezeptors mit anderen Steroidrezeptoren des Schweins, wie dem Mineralocorticoid-, Androgen-, Progesteron- und Östradiolrezeptors, ist in Abbildung 30 dargestellt.

Der Androgenrezeptor ist vollständig sequenziert und kodiert für 895 bzw. 898 Aminosäuren (TRAKOOLJUL et al., 2000; SONG et al., 2000). Während die Transaktivierungsdomäne oder Modulatorische Region keine Übereinstimmung zur entsprechenden Domäne des GCR aufweist, sind insgesamt im Bereich der DNA-Bindungsdomäne, Hingeregion und Hormonbindungsdomäne 54% der Aminosäuren identisch. Unter Berücksichtigung eines neutralen Aminosäureaustauschs werden 69% Übereinstimmungen erreicht. Die Leerstellen betragen 1%. 164 Aminosäuren des Mineralocorticoidrezeptors (PERREAU & MOISAN, 1997) und 132 Aminosäuren des Progesteronrezeptors (KETTLER et al., 2000), die einen Teil der Hormonbindungsregionen darstellen. Dabei sind 58 bzw. 54% der Aminosäuren identisch und bei 74 bzw. 75% handelt es sich um einen neutralen Austausch. Die Sequenz des Östradiolrezeptors umfasst 595 Aminosäuren (BOKENKAMP, 1994). 34% der Aminosäuren sind identisch (54% neutraler Austausch). 7% Ebenso konnte im C-terminalen Bereich des ER keine Übereinstimmung festgestellt werden. Der Homologievergleich basierend auf Blast Blosum 62 (ALTSCHUL et al. (1990).

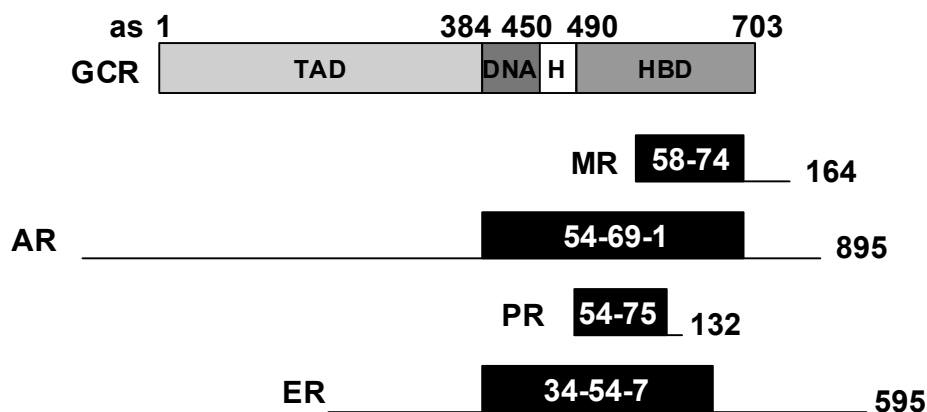


Abbildung 30: Homologie sequenzierter Steroidrezeptoren beim Schwein auf Aminosäureebene.

Der sequenzierte Bereich des GCR umfasst 703 as. Die sequenzierten Bereiche für MR, AR, PR und ER sind als Linie dargestellt. Homologien sind durch aufgesetzte Balken dargestellt, wobei sowohl die Übereinstimmung als auch die Übereinstimmung unter Berücksichtigung eines neutralen as-Austausches und die Lücken in Prozent angegeben sind

5.1.5.3 STRUKTURANALYSE DES GCR2.1

Die theoretische Vorhersage bestimmter antigener Proteindeterminanten anhand der Aminosäuresequenz erleichtert und beeinflusst die Sequenzauswahl für die Synthese rekombinanter Antigene. Die Lokalisierung antigener Determinanten basiert auf den verschiedenen Eigenschaften der Aminosäuren. Diese charakteristischen Einflussgrößen und Beurteilungskriterien für die GCR2,1 Aminosäuresequenz sind in Abbildung 31 graphisch dargestellt.

Die Aminosäuresequenz des GCR2,1 Proteins wurde nach HOPP & WOODS (1981) auf ihre hydrophilen Eigenschaften untersucht. Weiterhin spielt nach FRAGA (1992) die Interaktionsenergie zwischen Aminosäuren eine Rolle und erhöht in Kombination mit der Methode von HOPP & WOODS (1981) die Aussagekraft über die Antigenität in Form des *Recognition factors*. Die Bestimmungen von WELLING et al. (1985) basieren auf der Aminosäurezusammensetzung von bekannten antigenen Regionen und ergeben den *Antigenicity value X10*. Die Berechnung von zugänglichen, also an der Oberfläche befindlichen Aminosäureresten und von versteckten Aminosäurereste liegen den *accessible residues* und *buried residues* von JANIN (1979) zugrunde.

Es zeigt sich, dass vor allem in der Transaktivierungsdomäne eine hohe Anzahl antigener Regionen vorliegt. Allerdings weisen die verschiedenen Modelle unterschiedliche Regionen aus. Die DNA-Bindungsdomäne besitzt im Vergleich dazu geringe antigene Eigenschaften. In der Hinge- und Hormonbindungsregion des Rezeptors sind die antigenen Strukturen eher schwächer ausgeprägt.

Allerdings spielen für die Auswahl auch andere Kriterien eine Rolle, wie z.B. die Speziesspezifität (siehe Abbildung 29) und die Homologie (siehe Abbildung 30) innerhalb der Familie.

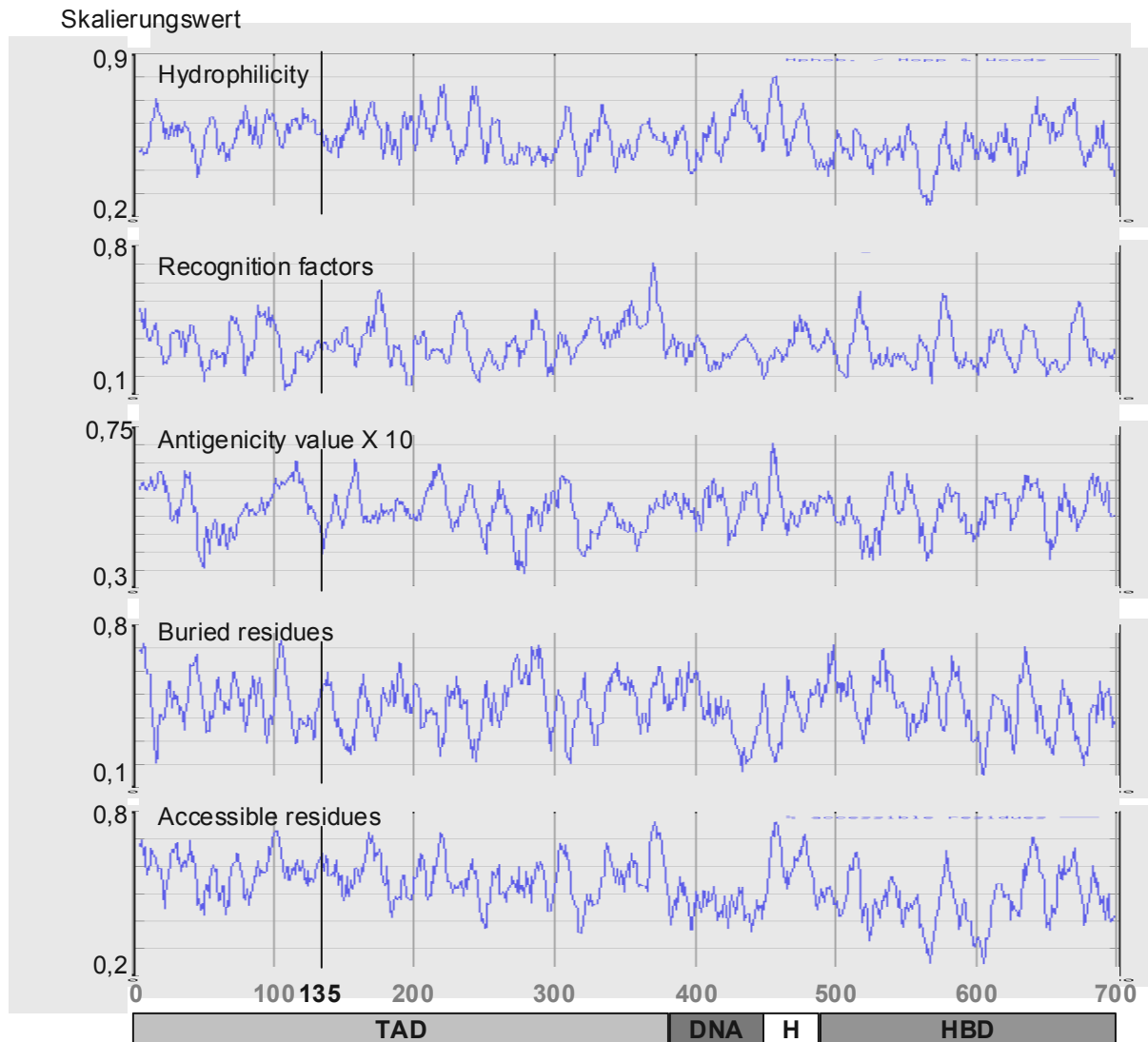


Abbildung 31: Voraussage antigener Determinanten

Von oben nach unten: nach HOPP & WOODS (1981), FRAGA (1992), WELLING et al. (1985), JANIN (1979)

5.2 SYNTHESE DES PGCRM ANTIGENS

Zur Herstellung eines gegen den porcinen GCR gerichteten Antiserums wurde ein cDNA-Fragment (*gcrmr*) aus der modulatorischen Region mittels PCR amplifiziert, kloniert und rekombinant exprimiert. Die kodierende porcine Sequenz wurde über addierte Restriktionsschnittstellen kloniert. Für die Expression des pGCR-Antigens fand das T7-Expressionssystem Anwendung: die Expression, die unter der Kontrolle des T7-Promoters auf dem Plasmid pETH-2a erfolgt, wird durch die Induktion der Expression im Genom des *E.coli* Stammes BL21(DE3) pLYS codierenden T7-Polymerase vermittelt.

5.2.1 AMPLIFIKATION DES PGCRM GENS (*GCRM*)

Primer für die Amplifikation des pGCRmr Gens waren an ihrem 5'-Ende um eine Restriktionsschnittstelle verlängert. Der Rückwärtsprimer enthielt zusätzlich ein Stoppcodon (Tabelle 2). Als Matrize diente Klon pGEMGCR2,1B. Das Ergebnis der *gcrmr*-PCR ist in Abbildung 32 dargestellt und zeigt ein Fragment mit der erwarteten Größe von 428 bp. Eine sehr schwache Bande wurde bei einer Größe von etwa 850 bp festgestellt.

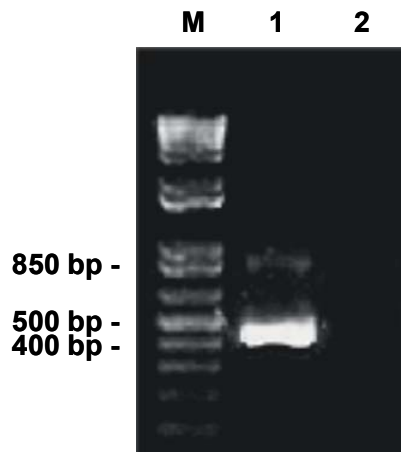


Abbildung 32: Amplifikation des pGCRmr Gens (*gcrmr*)

Spur M: 1 Kb Plus DNA Ladder™, Spur 1: *gcrmr* Gen, Spur 2: Negativkontrolle in 1,2 % Agarosegel. Pro Spur wurden 3 µL des PCR-Ansatzes aufgetragen.

Es wurden insgesamt 10 PCR-Reaktionen mit einem Volumen von 50 µL durchgeführt, dann mit PEG₆₀₀₀ gefällt und in 50 µL H₂O gelöst. Im Agarosegel wurde eine Konzentration von etwa 117 ng / µL und damit eine Gesamtmenge von etwa 5,85 µg *gcrmr* ermittelt.

5.2.2 KLONIERUNG DES PGCRM R GENS IN PETH-2A UND TRANSFORMATION IN *E. COLI* XL 1 BLUE

5.2.2.1 RESTRIKTIONSVERDAU DER GCRM R CDNA UND DES PET VEKTORS

Für den Restriktionsverdau der *gcrm r* cDNA wurden 50 U *Bam*HI und 30 U *Hind* III eingesetzt. Nach Inkubation über Nacht wurde die Reaktion auf einem 2% Agarosegel überprüft (Abbildung 33a). Die unverdaute *gcrm r* cDNA besteht aus 428 bp, beim Restriktionsverdau werden nur 11 bp abgespalten, wodurch ein Fragment mit 417 bp entsteht. Das verdaute *gcrm r* PCR-Produkt wurde im Agarosegel aufgetrennt, die 417 bp Bande ausgeschnitten und mit dem Cleanmix-Kit aufgereinigt. Es wurden 30 ng / μ L *gcrm r* isoliert.

Der Verdau des pET Vektors mit den Restriktionsenzymen *Bam*H I und *Hind* III führt theoretisch zu zwei Fragmenten, einem Insert von etwa 400 bp und dem Vektor mit 4 kb. Der unverdaute Vektor zeigt im Agarosegel eine breite Bande >10 kb. Nach dem enzymatischen Verdau wurden Vektorfragmente zwischen 5 und 10 kb, eine scharfe Bande bei 4 kb und das erwartete 400 bp Insert festgestellt (Abbildung 33b). Das 4 kb Fragment wurde durch Gelelektion nach der Auftrennung im Agarosegel weiter aufgereinigt. Aus 3 μ g wurden 7 ng / μ L isoliert. Anschließend wurde das Expressionsgen in die *cloning site* des pETH-2a Vektors unter die Kontrolle des T7-Promotors ligiert.

5.2.2.2 LIGATION UND TRANSFORMATION

Das so erhaltene Konstrukt, als pETGCRM r bezeichnet (siehe Abbildung 35), wurde zur Plasmidvermehrung in *E. coli* XL 1 Blue transformiert. Von 20 weißen, vermeintlich positiven Kolonien (Blau-weiß-Selektion) enthielten nur 7 Klone das pETGCRM r Plasmid. In Abbildung 34 ist das Ergebnis des PCR-Screening dargestellt. Nur bei den Klonen der Spuren 4, 6 und 8 konnte eine spezifische Bande mit etwa 430 bp amplifiziert werden.

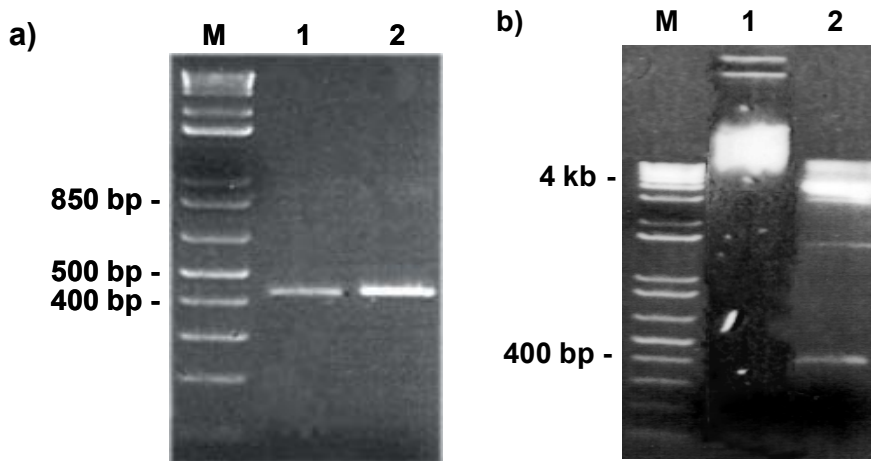


Abbildung 33: Restriktionsverdau des *gcrmr* cDNA-Fragments (a) und des pET Vektors (b)

a) Spur M: 1 Kb Plus DNA Ladder™, Spur 1: 1 µL einer 1:10 Verdünnung des Restriktionsverdaus der *gcrmr* cDNA, Spur 2: 1 µL unverdaute *gcrmr* cDNA (1:10 Verdünnung des PEG-Präzipitates) in 2% Agarosegel

b) Spur M: 1 Kb Plus DNA Ladder™, Spur 1: 8 µg unverdauter pET Vektor, Spur 2: 0,4 µg verdauter pET Vektor in 0,8% Agarosegel

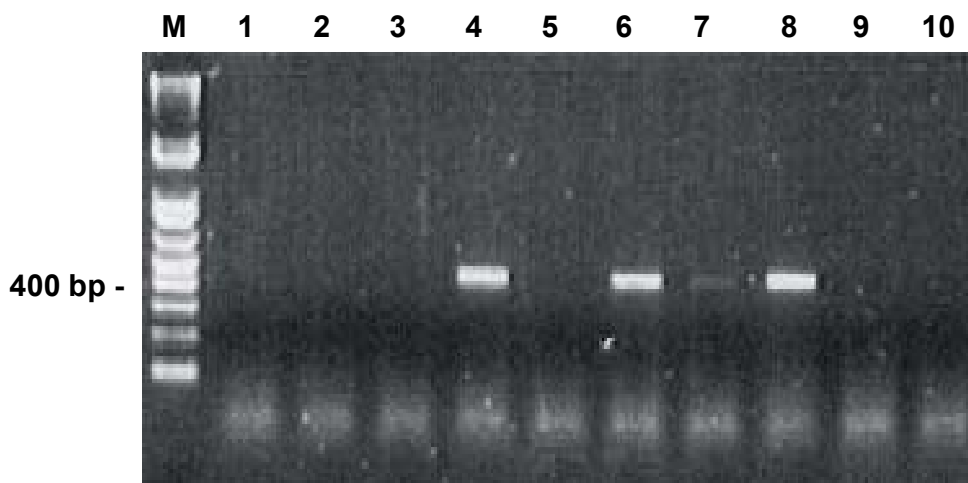


Abbildung 34: PCR-Screening auf pETGCRmr Klone

Spur M: 1 Kb Plus DNA Ladder™, Spur 4+6+7+8: pETGCRmr Klone, Spur 1+2+3+5+9: nicht pETGCRmr-plasmidtragende Klone Spur 10: Negativkontrolle auf 0,8% Agarosegel.

5.2.3 SEQUENZANALYSE DES PETGCRM

5.2.3.1 NUKLEOTIDSEQUENZ DES GCRM GENS

5 dieser pETGCRM(A-D) Klone wurden in *E.coli* XL 1 Blue vermehrt und anschließend die Plasmide isoliert. Die Sequenz der pET-Klone wurde mit der Konsensusnukleotidsequenz des pGCR2,1 Fragments verglichen (siehe Anhang). Klon A stimmt mit der Sequenz des pGCR2,1 Fragments überein. Klon B weist einen Nukleotidaustausch auf, der auch die Aminosäuresequenz beeinflusst. Zur Verschiebung des Leserahmens führen Deletionen in Klon C (2 Nukleotide) und in Klon D (ein Nukleotid).

5.2.3.2 EXPRESSIONSKONSTRUKT UND EXPRESSIONSTRATEGIE

Klon A wurde für die rekombinante Expression des pGCRM Proteins verwendet. Die Sequenzanalyse zeigt die Orientierung im Vektor und die Expressionsstrategie (Abbildung 35).

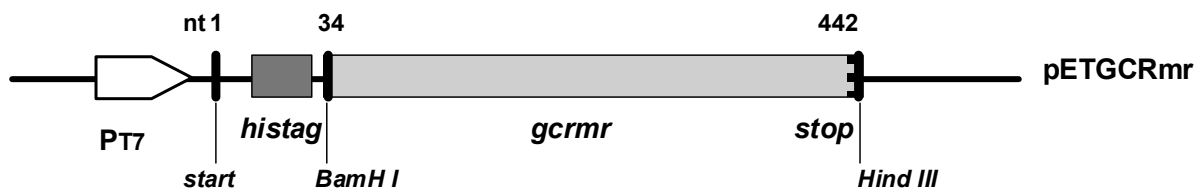


Abbildung 35: Expressionskonstrukt pETGCRM
Schematische Darstellung des T7-Promotors, Start, his-tag, Restriktionsschnittstellen und dem *gcrm* Gen

Abbildung 36 zeigt im Detail die Nukleotidsequenz des Klon A, und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Expressionsproduktes. Das Expressionsprodukt pGCRM umfasst 147 Aminosäuren mit einem rechnerischen Molekulargewicht von 15,1 kDa.

```

as 1 Met Ala Ser His His His His His His Gly Gly Ser Val Ser Ala Ser Ser Pro Ser Leu 20
nt 1 a t g g c t a g c c a c c a t c a c c a t c a c c a t g g t g g a t c c g t t t c t g c g t c t t c a c c c t c c c t g 60

21 Ala Ala Val Ser Gln Pro Asp Ser Lys Gln Gln Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro Lys Gly 40
61 g c t g c t g t g t c t c a g c c a g a c t c c a a g c a g c a g a g g c t t g c g g t g g a c t t t c c a a a a g g c 120

41 Ser Gly Ser Asn Ala Gln Gln Pro Asp Leu Ser Lys Ala Val Ser Leu Ser Met Gly Leu 60
121 t c a g g a a g c a a t g c a c a g c a g c c a g a t c t g t c c a a g g c a g t t t c a c t c t c c a t g g g a c t g 180

61 Tyr Met Gly Glu Thr Glu Thr Lys Val Met Gly Ser Asp Leu Gly Phe Pro Gln Gln Gly 80
181 t a c a t g g g a g a g a c c g a a a c t a a a g t g a t g g g a a g t g a c c t g g g a t t c c c a c a g c a g g g c 240

81 Gln Ile Ser Leu Ser Ser Gly Glu Thr Asp Phe Arg Leu Leu Glu Glu Ser Ile Ala Asn 100
241 c a a a t c a g c c t t t c c t c t g g g a g a c a g a c t t c c g g c t t c t g g a a g a a a g c a t c g c a a a c 300

101 Leu Ser Arg Ser Thr Ser Val Pro Glu Asn Pro Lys Ser Ser Ala Ser Ala Ala Gly Pro 120
301 c t c a g t a g g t c g a c c a g t g t t c c a g a g a a c c c c a a g a g t t c a g c c t c c g c t g c t g g t c c t 360

121 Ala Ala Pro Ala Glu Lys Ala Phe Pro Lys Thr His Ser Asp Gly Ala Pro Glu Gln Pro 140
361 g c t g c t c c g g c a g a g a a g g c g t t t c c a a a a c c c a c t c t g a t g g g g c t c c a g a g c a g c c g 420

141 Asn Val Lys Gly Gln Thr Gly Stop Pro Lys Leu Gly 147
421 a a t g t g a a g g g t c a g a c t g g c t a a c c c a a g c t t g g g 457

```

Abbildung 36: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Expressionsproduktes pGCRmr des pETGCRmr Plasmids
 Der pETH-2a Expressionsvektor enthält einen T7-RNA-Polymerase-Promotor. Dem Startkodon folgt ein His-tag von 6 Histidinen, gefolgt von einer *Bam*H I Restriktionsschnittstelle. Die für den Rezeptor kodierende Sequenz beginnt bei nt 34 und wird terminiert durch das Stoppkodon an Position nt 442. Die *Hind* III Klonierungsstelle folgt.

5.2.4 TRANSFORMATION DES pETGCRMR KONSTRUKTES IN E.COLI BL21(DE3)pLYS

Für die Expression des Proteins wurde das pETGCRmr Plasmid A in *E. coli* BL21 (DE3) pLys transformiert. Die Effizienz dieser Transformation lag bei 100 %. Alle gepickten Kolonien enthielten das Plasmid (Abbildung 37).

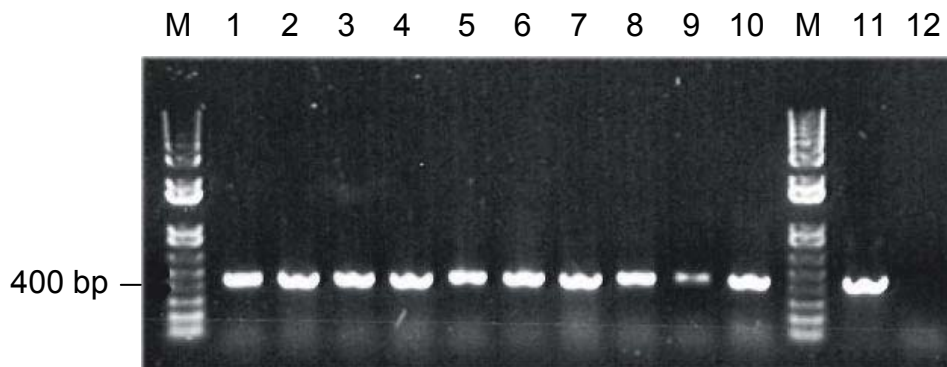


Abbildung 37: Transformation des pETGCRmr Konstruktes in *E. coli* BL21(DE3) pLys

Spur M: 1 Kb Plus DNA Ladder™, Spur 1-11: pETGCRmr Klone, Spur 12: Negativkontrolle auf 0,8 %igem Agarosegel (9 µL PCR-Ansatz)

5.2.5 EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DES PGCRMR PROTEINS

Die Expression des Antigens als his-tag Fusionsprotein erfolgt mit dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Konstrukt. Als Wirtstamm wurde *E. coli* BL21 (DE3) pLys verwendet. Die Induktion der rekombinanten Expression in *E. coli* erfolgte über 3 h. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE der Gesamtzellproteine untersucht (Abbildung 39). Als Negativkontrolle diente eine nicht induzierte Kultur (Spur 1). In Spur 2 ist die induzierte Bakterienkultur dargestellt; zwei Proteine von etwa 28 und 15 kDa wurden verstärkt exprimiert.

Die Aufreinigung des Fusionproteins erfolgte affinitätschromatographisch über Ni-NTA-Agarose, welche unter basischen Bedingungen einen Metal-Chelat-Komplex zwischen den Ni-Ionen und den Histidinresten ausbildet. Zur Optimierung wurden verschiedenen Waschschrte mit Waschpuffern unterschiedlichen pHs getestet. Eine Aufreinigung (I) erfolgte mit der Pufferkombination A, B, D (pH 6,3) und E (pH 4,5). Zur Optimierung wurde eine zweite Aufreinigung (II) mit einem zusätzlichen Waschschrte gewählt, hierbei wurden folgende Puffer verwendet: A, B, C (pH 6,8), D (pH 6,3) und E (pH 4,5). In den einzelnen Fraktionen wurden die Proteingehalte bestimmt (Abbildung 38)

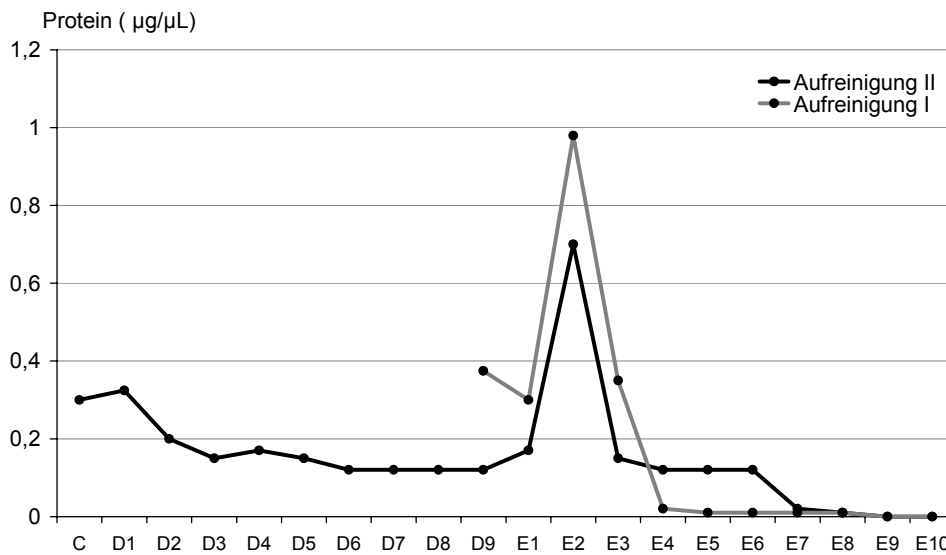


Abbildung 38: Proteinkonzentrationen der Waschpuffer C und D (1-9) und der Eluate E (1-10) der Aufreinigung I und II

Der Waschpuffer D der Aufreinigung I enthielt 0,375 µg/µL Protein. Die Elution mit Puffer E zeigt eine starke Proteinanreicherung in Fraktion E 2 mit 0,98 µg/µL Protein. Die Fraktionen E4 bis E10 enthalten keine relevanten Proteinkonzentrationen mehr.

In Aufreinigung II mit dem zusätzlichen Waschschrift mit Puffer C (0,3 µg/µL Protein), konnten in den Fraktionen D1 bis D9 Proteingehalte zwischen 0,12 und 0,325 µg/µL gemessen werden. Auch hier zeigt sich eine starke Proteinanreicherung in Fraktion E2 mit 0,7 µg/µL.

Zur näheren Charakterisierung der Proteine in den Wasch- und Elutionsfraktionen wurden diese auf einem 15 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und gefärbt. In Abbildung 39 ist die Aufreinigung I dargestellt. In Spur 3 bis 6 wurde jeweils 1 µg Protein der Waschfraktion D und der Elutionsfraktionen 1 bis 3 aufgetragen.

Der Waschpuffer D enthält verschiedenste Proteine aber auch einen großen Anteil des 15 kDa Proteins. Die Eluate 1 und 3 zeigen eine Anreicherung des 15 kDa Proteins. Die Eluate 1 und 2 weisen zusätzlich eine Bande bei 28 kDa auf, die auch in Eluat 3 noch sehr schwach zu erkennen ist.

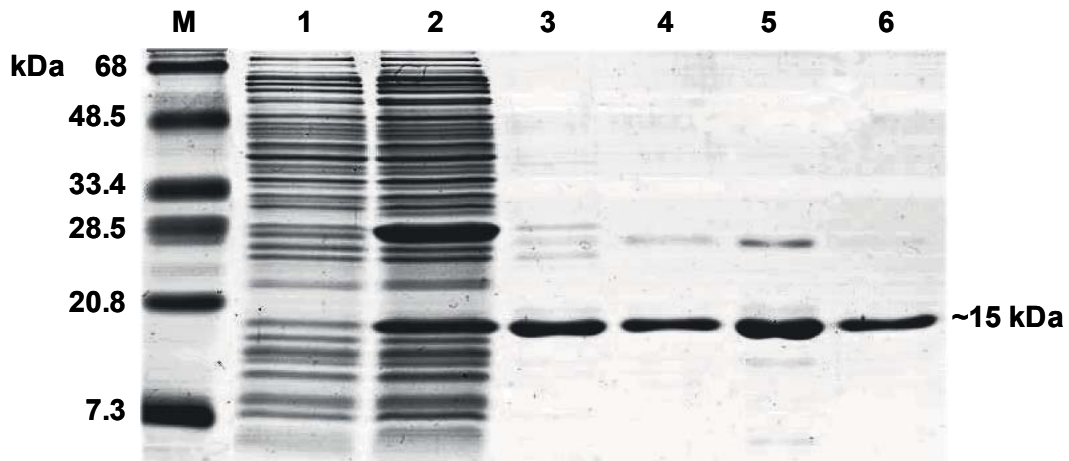
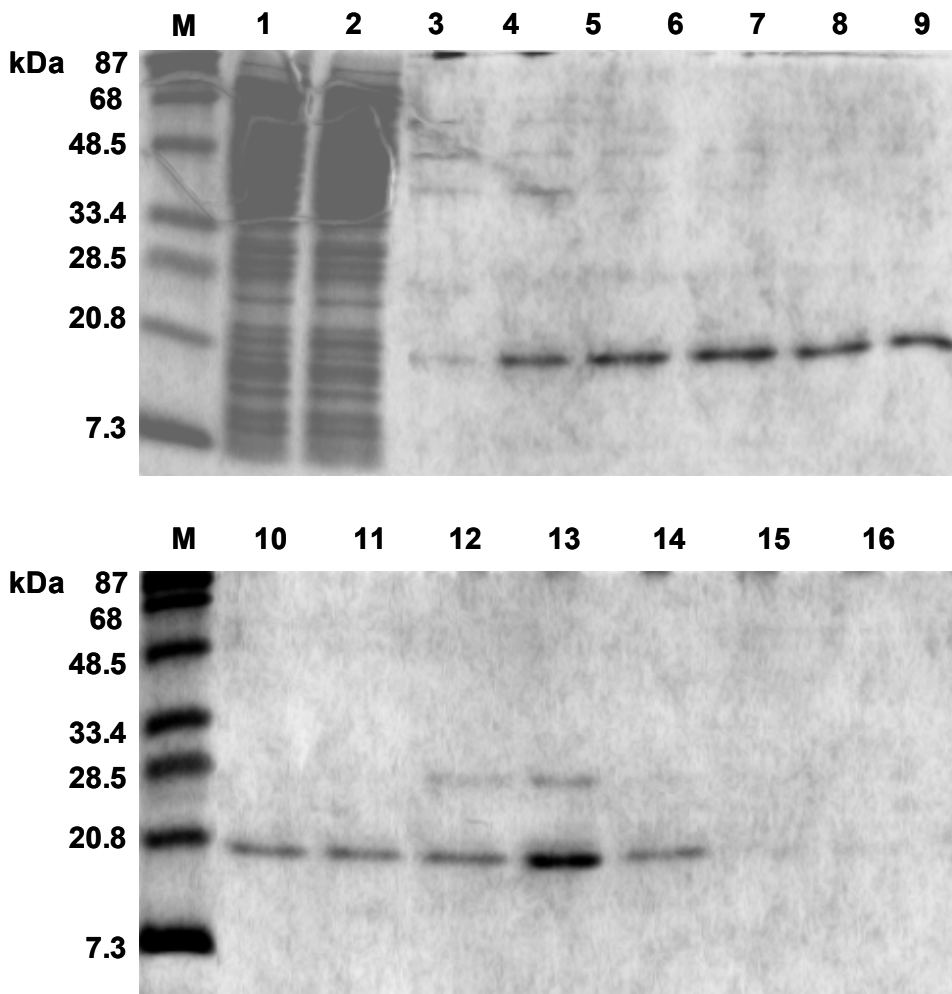


Abbildung 39: SDS-PAGE der rekombinanten Expression des pGCRmr-Antigens und der Aufreinigung

Spur M: BenchMark™ Prestained Protein Ladder, Spur 1: nichtinduzierte Klultur (BL21 (DE3) pLys), Spur 2: induzierte Kultur, Spur 3: Waschschrift C, Spur 4: Eluat 1; Spur 5: Eluat 2, Spur 6: Eluat 3

Bei der zweiten Aufarbeitung wurde jeweils 1 µg Protein des Waschpuffers C, der Waschfraktionen D3-9 und der Eluate E1-4 auf ein 15 % Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Färbung mit Coomassie Blau ist in Abbildung 40. dargestellt. Waschpuffer C enthält eine Vielzahl verunreinigender Proteine, aber auch eine schwache 15 kDa Bande. Die einzelnen Fraktionen des Waschpuffers D weisen eine starke Anreicherung des 15 kDa Proteins auf und mit fortschreitendem Waschen nimmt der Anteil kontaminierender Proteine ab. In den Eluaten 1 bis 3 befindet sich zum Großteil nur das 15 kDa Protein, jedoch zeigte sich hier auch eine starke Elution des 28 kDa Proteins. In Eluat 4 sind keine Banden mehr detektierbar.

**Abbildung 40:** SDS-PAGE der Aufreinigung II

Spur 1: Waschpuffer C, Spur 2: Waschpuffer D3, Spur 3: Waschpuffer D4, Spur 4: Waschpuffer D5, Spur 5: Waschpuffer D6, Spur 6: Waschpuffer D7, Spur 7: Waschpuffer D8, Spur 8: Waschpuffer D9, Spur 9: Eluat 1, Spur 10: Eluat 2, Spur 11: Eluat 3, Spur 12: Eluat 4

Zur weiteren Aufreinigung wurden die Fraktionen 1 bis 3 der Aufreinigung I gepoolt und gegen PBS-Puffer dialysiert. Das Dialysat enthielt 2,1 mg Protein / mL. Für die präparative SDS-PAGE des pGCRmr-Antigens wurden jeweils 112 µg Protein in 15 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die 15 kDa Bande ausgeschnitten und in PBS-Puffer homogenisiert. Das Homogenat wurde direkt für die Immunisierung verwendet.

5.2.5.1 CHARAKTERISIERUNG DES EXPRESSIONSPRODUKTS MIT ANTI-HIS-ANTIKÖRPERN

Zur weiteren Charakterisierung wurde eine Verdünnungsreihe von 100 ng bis 190 pg des dialysierten pGCRmr-Antigen elektrophoretisch aufgetrennt (4 % Sammelgel, 15 % Trenngel) und auf eine PVDF-Membran elektrogeblottet. Das Antigen wurde mit einem Anti-His-Antikörper (1:2000) von Quiagen detektiert (Abbildung 41).

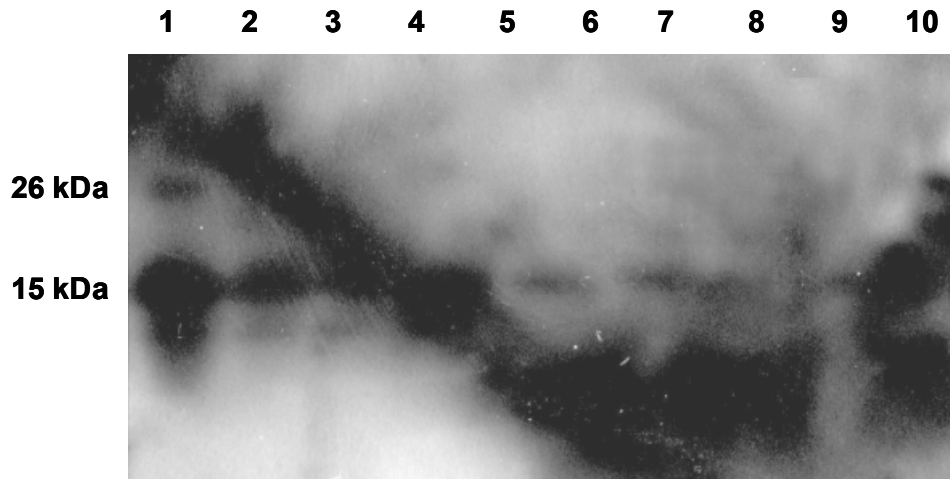


Abbildung 41: Immunoblot des pGCRmr Proteins mit Anti-His-Antikörpern
Spur 1: 100 ng, Spur 2: 50 ng, Spur 3: 25 ng, Spur 4: 12,5 ng, Spur 5: 6,25 ng,
Spur 6: 3,125 ng, Spur 7: 1,55 ng, Spur 8: 790 pg, Spur 9: 390 pg, Spur 10: 185
pg pGCRmr Protein

5.3 CHARAKTERISIERUNG DES POLYKLONALEN ANTISERUMS

5.3.1 WESTERN BLOT

5.3.1.1 WESTERN BLOT ANTIGEN

Eine Verdünnungsreihe des dialysierten pGCRmr-Antigen mit 100 ng bis 190 pg wurde hergestellt und nach SDS-PAGE in 4 % Sammelgel und 15 % Trenngel auf eine PVDF-Membran elektrogeblottet. Das Antigen wurde mit 1:2500 der IgG-Fraktion des pGCRmr-Antiserums, einem HRP-konjugierten Anti-Rabbit-Ak und ECL als Substrat nachgewiesen. Spur 1 und Spur 2 weisen mehrere Proteinbanden bei 33, 28, 15 und eine Bande kleiner 15 kDa auf. Mit zunehmender Verdünnung ist nur noch die Bande des 15 kDa Proteins nachweisbar. Die Nachweisgrenze liegt in diesem System bei 390 pg (Abbildung 42).

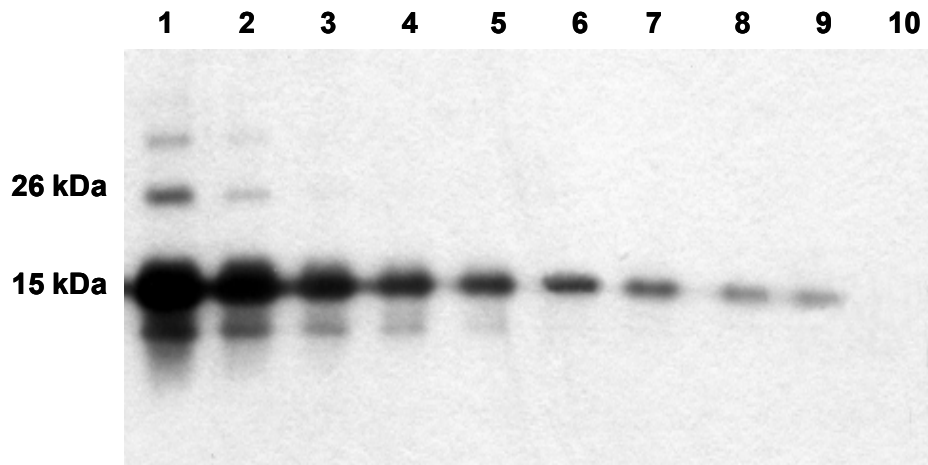


Abbildung 42: Immunoblot des pGCRmr Proteins mit Anti-pGCRmr-IgG
Spur 1: 100 ng, Spur 2: 50 ng, Spur 3: 25 ng, Spur 4: 12,5 ng, Spur 5: 6,25 ng,
Spur 6: 3,125 ng, Spur 7: 1,55 ng, Spur 8: 790 pg, Spur 9: 390 pg, Spur 10: 185
pg pGCRmr Protein

Die densitometrische Auswertung des Western blots (Abbildung 43) zeigt eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration und der Signalstärke zwischen 50 und 6,25 ng pGCRmr Protein. Bei 100 ng führte das Chemilumineszenzsignal

zu einer Überbelichtung des Films. Daher wurde das Signal der Spur 2 mit 50 ng pGCRmr Protein 100% gesetzt.

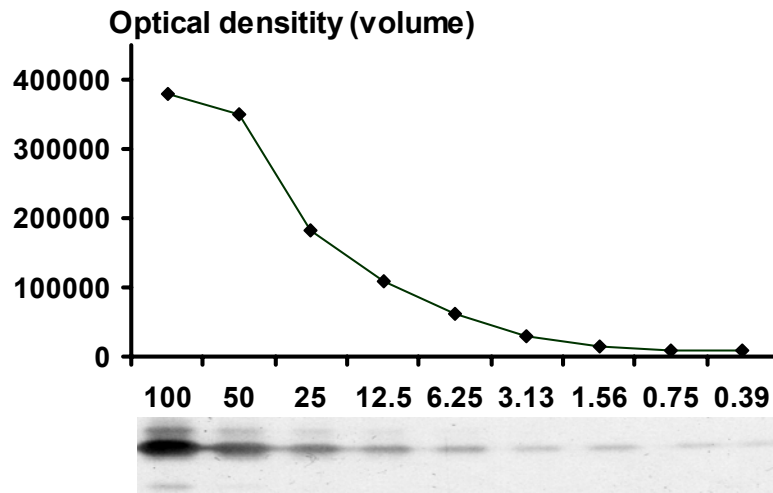


Abbildung 43: Densitometrische Auswertung des pGCRmr Western Blots

5.3.1.2 WESTERN BLOT MIT RADIOAKTIV MARKIERTEM REZEPTOR UND SZINTILATIONSMESSUNG

Die Migration des radioaktivmarkierten GCR in der SDS-PAGE wurde bestimmt und mit dem immunologischen Nachweisverfahren verglichen. Es zeigt sich im Western blot (Abbildung 44 rechts), dass die Anti-pGCR-Antikörper an denaturierte cytosolische Proteine mit einem Molekulargewicht von 87 kDa, 75,8 kDa und 68,4 kDa binden. Die stärkste Färbung zeigt hierbei die 87 kDa Bande. Keine Färbereaktion wurde mit Präimmunserum und bei kompetitiver Hemmung mit pGCRmr Protein festgestellt. Bei den beiden kleineren Proteinen handelt es sich evtl. um proteolytische Spaltprodukte des Rezeptors, zumal ihre Färbung mit pGCRmr Peptid unterbunden werden kann.

Der Vergleich mit der Migration des ^3H -Dexamethason markierten cytosolischen Proteins in Abbildung 44 (links) zeigt, dass die spezifische Bindung der 87 kDa Bande entspricht. Ein spezifischer Peak von 350 cpm wurde detektiert. Eine unspezifische Bindung (NSB) des ^3H -Dexamethason konnten nicht nachgewiesen werden.

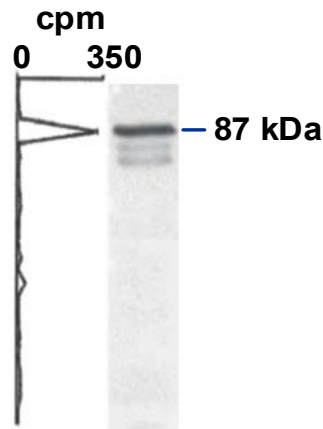


Abbildung 44: Vergleich zwischen Western blot Analyse (links) und der Wanderung des ^3H -Dexamethason markierten cytosolischen GCR in SDS-PAGE (rechts)

5.3.1.3 WESTERN BLOT MIT CYTOSOLISCHEM THYMUSPROTEIN

Eine Verdünnungsreihe mit 200, 100, 50, 25, 12,5 und 6,25 μg cytosolischem Protein aus Thymusgewebe wurde mittels SDS-PAGE in 4 % Sammelgel und 15 % Trenngel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran elektrogeblottet. Für die Immunfärbung wurde eine 1:2500 Verdünnungen der IgG-Fraktion des pGCRmr-Antiserums, HRP-konjugierter Anti-Rabbit-Ak und ECL als Substrat verwendet (Abbildung 45). Starke Signale wurden von zwei Proteinbanden mit 89 und 68,1 kDa erfasst. Proteine mit einer Größe von 47,4 und 43,3 kDa waren nur beim Proteinauftrag von 200 μg schwach zu detektieren. Prinzipiell ist eine Detektion des Signals bis zu einer Proteinmenge von 25 μg möglich. Bei 12,5 und 6,25 μg Protein konnte keine Lichtemission festgestellt werden. Die densitometrische Auswertung des Blots ergab eine lineare Beziehung zwischen dem Chemilumineszenzsignal und der aufgetragenen Proteinmenge im Bereich zwischen 100 und 25 μg Protein / Spur.

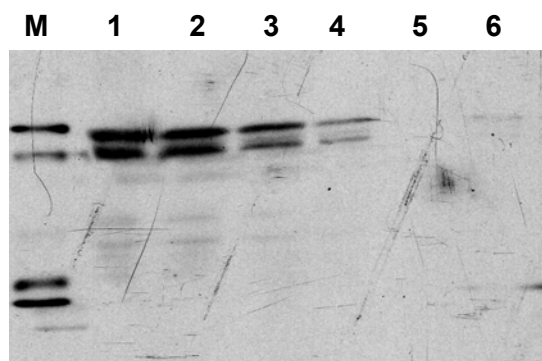


Abbildung 45: Immunoblot der Verdünnungsreihe an cytosolischem Protein aus Thymusgewebe

Spur M: ECL Protein Molekulargewichts Marker, Spur 1: 200 μg , Spur 2: 100 μg , Spur 3: 50 μg , Spur 4: 25 μg , Spur 5: 12,5 μg , Spur 6: 6,25 μg cytosolisches Protein

5.3.1.4 OPTIMIERUNG DER ANTIKÖRPERKONZENTRATION

Zur Optimierung der Antikörperkonzentration wurden jeweils 100 µg cytosolisches Protein aus Thymusgewebe (Abbildung 46a) und aus Colongewebe (Abbildung 46b) im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend folgte die Immunfärbung mit verschiedenen Anti-pGCR-IgG Verdünnungen von 1:500 bis 1:10 000. Die Spuren 1 bis 3 in Abbildung 46 a) zeigen eine starke Färbung von Proteinen mit folgendem Molekulargewicht: 90,6, 67,9, 47,3, 40,2, 38, 35,7 kDa. In Spur 4 mit einer Verdünnung von 1:4000 sind die Proteine mit dem geringeren Molekulargewicht nur noch schwach zu detektieren, die Banden bei 90,6 und 67,9 zeigen ein deutliches Signal. Ab einer Verdünnung von 1:8000 wurde kein Signal festgestellt. Bei kompetitiver Hemmung einer 1:2000 Verdünnung des Anti-pGCR-IgG durch Vorinkubation mit 100 ng pGCRmr sind nur noch Proteine mit 47,3, 40,2 und 38, 35,7 kDa detektierbar.

Die Optimierung der Antikörperkonzentration für Colocyctosol (Abbildung 46b) zeigt selbst bei der geringsten Verdünnungsstufe nur eine schwache Färbung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 89,8, 68,1 und 40 und 38 kDa. Bei einer Verdünnung von 1:2000 sind keine Proteine detektierbar. Die Negativkontrolle mit Präimmunserum weist ebenfalls keine Banden auf.

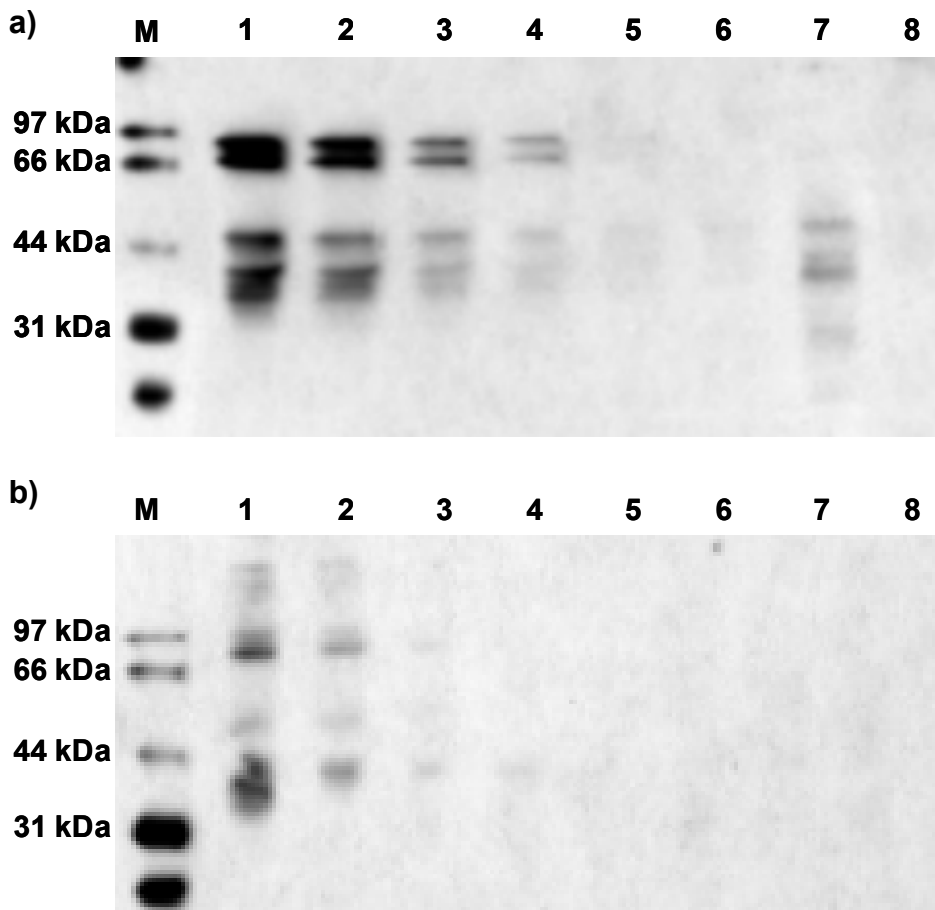


Abbildung 46: Optimierung der Anti-pGCR-IgG Verdünnung im Westen blot
 a) Cytolisches Protein aus Thymushomogenat. b) Cytolisches Protein aus Colonhomogenat. Spur M: ECL Protein Molekulargewichts Marker, Spur 1: 1:500, Spur 2: 1:1000, Spur 3: 1:2000, Spur 4: 1:4000, Spur 5: 1:8000, Spur 6: 1:10 000, Spur 7: 1:2000+ 100 ng pGCRmr (Vorinkubation), Spur 8: Präimmunserum

5.3.2 IMMUNPRÄZIPITATION MIT AKTIVIERTEM UND INAKTIVIERTEM REZEPTOR

Die Western blot Analyse zeigt, dass die Anti-pGCR-Antikörper den denaturierten GCR erkennen, bei dem die Epitope mit großer Wahrscheinlichkeit zugänglich sind. Ein Immunpräzipitationsassay unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde verwendet, um nachzuweisen, ob die Antikörper mit dem Rezeptor in seiner ligandengebundenen (Abbildung 47) oder nicht ligandengebunden (Abbildung 48) Form reagieren. Die Immunpräzipitation dient damit auch der Absicherung der immunhistochemischen Anwendung.

Zur Etablierung der Immunpräzipitation wurde eine NaCl-Optimierung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Präimmunserum eingesetzt und ein Ansatz ohne Antiserum durchgeführt. Als weitere Kontrolle wurde mit pGCRmr~Antigen geblockt.

Der Nachweis erfolgte durch anschließende Elektrophorese der Immunpräzipitate und der Immunfärbung mit Anti-pGCR-IgG, sekundärem Anti-Rabbit-Antiserum und ECL.

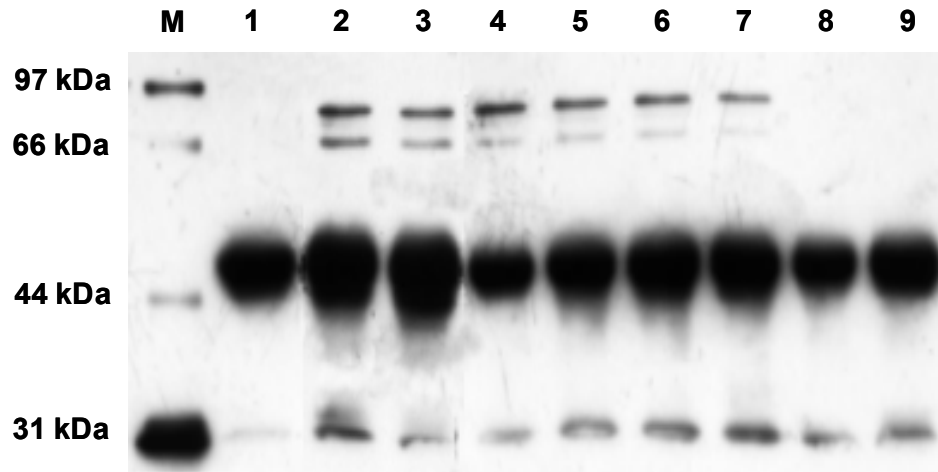


Abbildung 47: Immunpräzipitation mit Dexamethason Vorinkubation
 Spur M: ECL Protein Molekulargewichts Marker, Spur 1: Negativkontrolle (Sephrose A), Spur 1: ohne NaCl, Spur 2: 50 mM NaCl, Spur 3: 100 mM NaCl, Spur 4: 150 mM NaCl, Spur 5: 200 mM NaCl, Spur 6: 250 mM NaCl, Spur 7: 300 mM NaCl, Spur 8: ohne NaCl + 100 pg pGCRmr, Spur 9: Präimmunserum

In Abbildung 47 ist der Western blot zur Optimierung der NaCl-Konzentration im Lysepuffer der Immunpräzipitation dargestellt. Die Negativkontrolle ohne Antikörper zeigt, dass keine unspezifische Rezeptorbindung durch Sepharose-A stattfand (Spur 1). Durch die Optimierung der NaCl-Konzentration im Lysepuffer konnte mit steigender Konzentration eine selektive Antikörperreaktion hervor gerufen werden (Spur 2-7). Diese Reaktion kann durch Vorinkubation mit 1 μ g pGCRmr Peptid gehemmt werden (Spur 8). Kein Rezeptor wurde mit Präimmunserum gebunden (Spur 9). Die starke Bande bei ca. 45 kDa entspricht der Fc-Domäne und die schwache Bande bei 31 kDa der Fab-Domäne der Antikörper.

Die Immunpräzipitation ohne Dexamethason Vorinkubation, in Abbildung 48 dargestellt, weist ein gegenteiliges Resultat auf; mit zunehmender NaCl-Konzentration werden verstärkt zwei Banden mit 90 und 68 kDa detektiert. Mit 50 bis 100 mM NaCl im Lysepuffer ist spezifisch ein einzelnes Protein mit 90 kDa nachzuweisen. Bei höheren Salzkonzentrationen treten verstärkt zwei Proteinbanden mit 90 und 68 kDa auf. Dies ist evtl. auf die Abspaltung des HSP-Komplexes zurückzuführen.

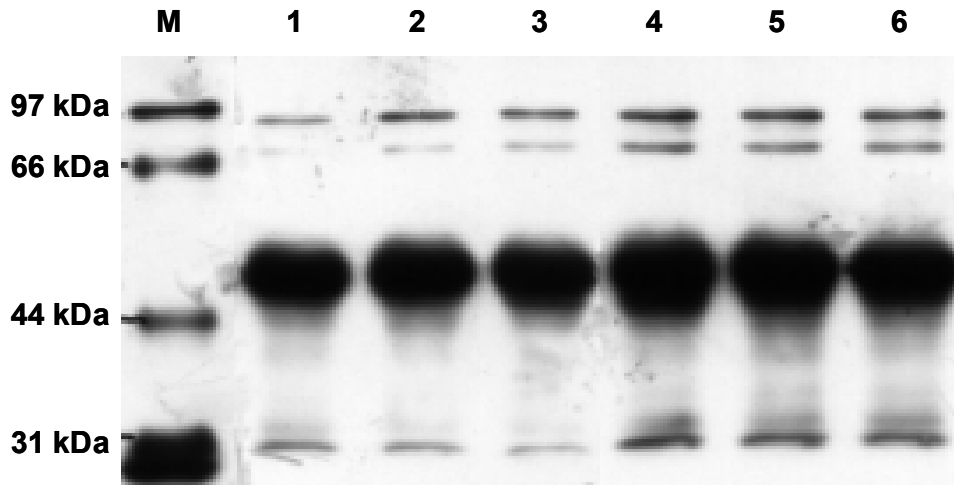


Abbildung 48: Immunpräzipitation ohne Dexamethasen Vorinkubation
Spur M: ECL Protein Molekulargewichts Marker, Spur 1: 50 mM NaCl, Spur 2: 100 mM NaCl, Spur 3: 150 mM NaCl, Spur 4: 200 mM NaCl, Spur 5: 250 mM NaCl, Spur 6: 300 mM NaCl

5.3.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE ANWENDUNG DES ANTI-pGCR-IgG

Die immunhistochemische Anwendung des Antiserums wurde an Thymusschnitten etabliert.

Nach einer Methanol/Eisessig Fixierung wurde die GCR Detektion mit Anti-pGCR-IgG in einer Verdünnung von 1:1000 durchgeführt. Die Färbereaktion basiert auf biotinyliertem Schaf Anti-Rabbit-IgG, Streptavidin-HRP und DAB. Die Immunfärbung der Thymusschnitte zeigt eine starke Reaktion des Anti-pGCR-Antiserums mit dem GCR (Abbildung 49).

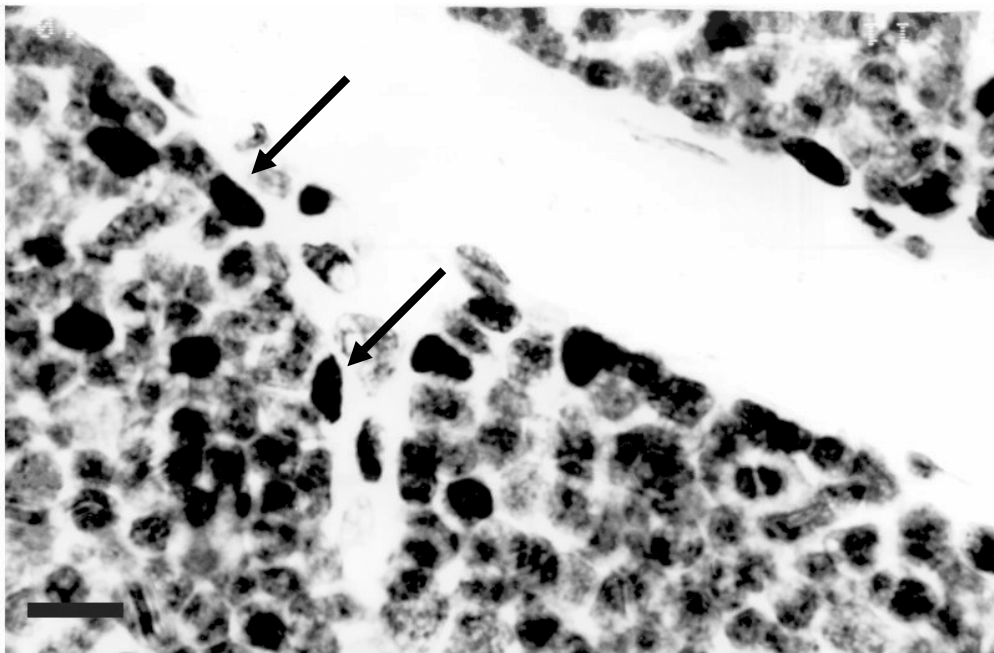


Abbildung 49: GCR Immunfärbung in Thymusschnitten

Einzelne gefärbte Zellen sind durch die Pfeile markiert. Die Gewebsschnitte sind 3 μm dick. Vergrößerung x100. Der Balken entspricht 13 μm .

Zur Absicherung der Spezifität wurden verschiedene Negativkontrollen durchgeführt. Die Vorinkubation des Antiserums mit den Peptiden IGF-1 und Insulin beeinflusst die Bindungscharakteristika in Bezug auf die GCR Spezifität nicht, d.h. es wurde keine Färbereaktion festgestellt (nicht dargestellt). Weiterhin konnte durch die kompetitive Hemmung der Antikörperreaktion mit dem pGCRmr Peptidantigen eine unspezifische Färbung ausgeschlossen werden (Abbildung 50).

Die Anwendung der beschriebenen Detektionsmethode ohne den ersten Antikörper bestätigt weiter die Spezifität, auch hier wurde keine Immunreaktion festgestellt.

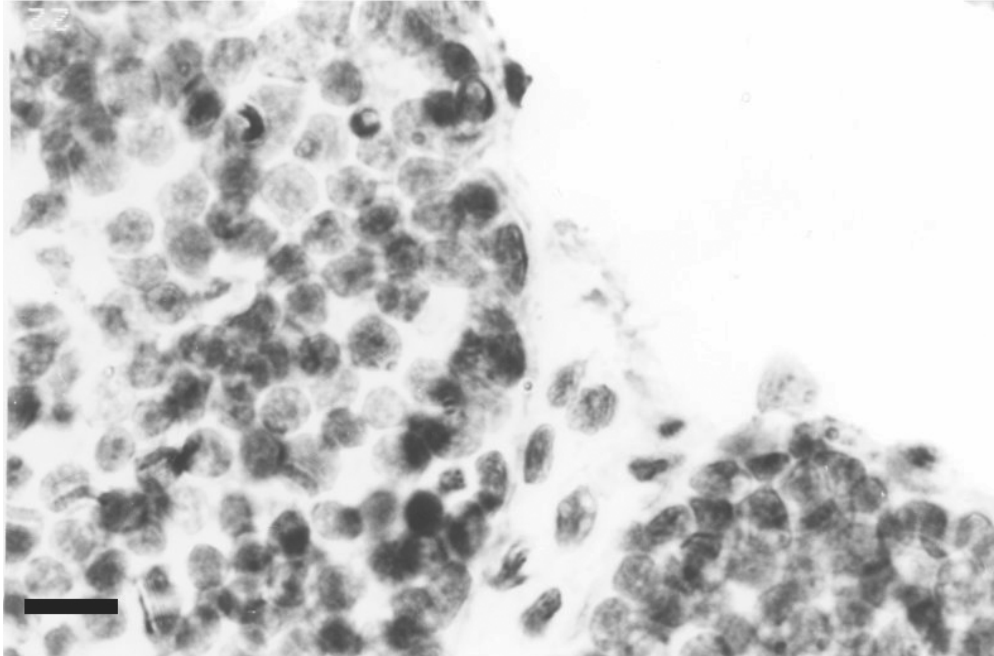


Abbildung 50: Kompetitive Hemmung der GCR Immunfärbung in Thymusgewebsschnitten durch Vorinkubation des Anti-pGCR-IgG mit pGCRmr. Die Gewebsschnitte sind 3 μm dick. Vergrößerung x100. Der Balken entspricht 13 μm .

Das selbe Material wurde mit dem Antikörper gegen den humanen Rezeptor behandelt. Hier konnte keine Färbereaktion von rezeptortragenden Zellen festgestellt werden.

5.3.4 CHARAKTERISIERUNG DES GCR IM INTESTINALTRAKT UNTER DEM EINFLUß VON ANDROGENEN

5.3.4.1 BESTIMMUNG DES IMMUNREAKTIVEN IN DEN ZELLKOMPARTIMENTEN UND DARMABSCHNITTEN GCR MITTELS WESTERN BLOT

Zur semiquantitativen Bestimmung des GCR Gehalts im Intestinaltrakt und zur Charakterisierung der intrazellulären Verteilung des Rezeptors wurden 100 µg Protein der Cytosol- und Kernfraktion elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und immungefärbt. Eine einzelne Proteinbande des GCR wurde bei einer Größe von 89 kDa detektiert (Abbildung 51). Das Chemilumineszenzsignal wurde densitometrisch ausgewertet und das Volumen bestimmt.

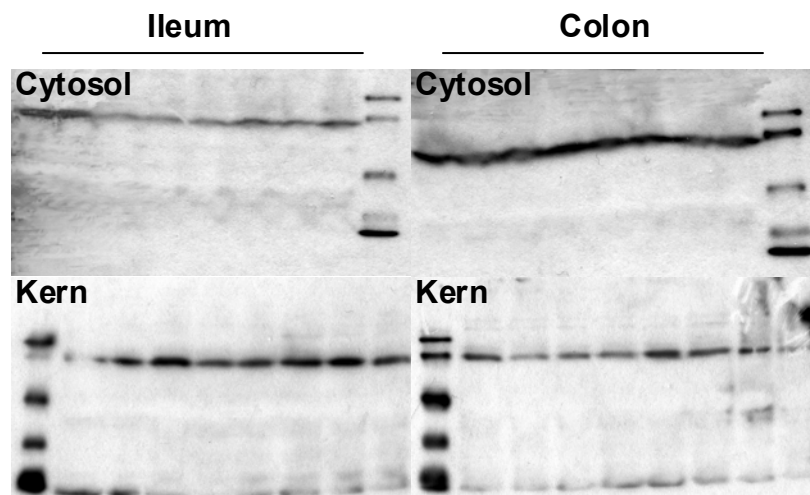


Abbildung 51: Intrazelluläre GCR Verteilung im Ileum und Kolon von Ebern (Probenspur 1-4) und Kastraten (Probenspur 5-8)

Über die intrazelluläre Rezeptorverteilung kann folgenden Aussage getroffen werden:

- In den einzelnen Darmabschnitten besteht zwischen Kastraten und Ebern sowohl in der Cytosol als auch in der Kernfraktion kein entscheidender Unterschied
- Im Ileum ist der Anteil des GCR im Cytosol kleiner als im Kern
- Im Kolon ist der Anteil des GCR im Cytosol größer als im Kern

Addiert man die Volumina der ermittelten OD des cytosolischen Rezeptors und des Rezeptors der Kernfraktion und setzt diese Summe 100 %, so befinden sich bei Kastraten im Ileum 33 % des Rezeptors im Cytosol und 67 % im Kern. Im Kolon ist die Relation umgekehrt, hier liegen 65 % des GCR im Cytosol und 35 %

im Kern vor. Die intrazelluläre Verteilung bei Ebern beträgt für die Cytosolfraktion des Ileum 36 %. Im Kolon befinden sich 65 % der Rezeptoren im Cytosol und nur 35 % im Kern.

5.3.5 CHARAKTERISIERUNG DES IMMUNREAKTIVEN GCR IM INTESTINALTRAKT UNTER DEM EINFLUß VON ANDROGENEN

Die Verteilung des GCR in den einzelnen Abschnitten des Intestinaltraktes (Duodenum, Jejunum, Colon ascendens, Colon descendens) unter dem Einfluß von Androgenen wurde immunhistochemisch untersucht. Die Ergebnisse sind nachfolgend tabellarisch (Tabelle 8) zusammengefasst. Pro Region und Zelltyp wurden 500 Zellen gezählt.

Die Varianzanalyse mit GLM SAS zeigt, dass keine starken Einzeltiereffekte vorliegen, nur im Colon descendens ist ein schwach signifikanter Einfluß zu beobachten. Das Kriterium Zelltyp Zellen der Mucosa oder der Lamina propria zeigt in allen Darmabschnitten eine sehr starke hoch signifikante Gewichtung. Im Jejunum trägt die Gewichtung des Geschlechts über dem des Zelltyps. In den proximalen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts besteht bezüglich der Verteilung der verschiedenen GCR tragenden Zelltypen in der Krypten- und Zottenregion eine starke Ausprägung. Hingegen ist im Colon kein Effekt zu erwarten. Das Geschlecht spielt wiederum im Dünndarm und im Colon ascendens eine gewichtige Rolle. Es bestehen auch zwischen den beiden Gruppen und der Anzahl gefärbter Mucosazellen und Zellen der Lamina propria signifikante Unterschiede. Im distalen Kolon bestehen keine Gruppenunterschiede.

Tabelle 8: Durchschnittliche Anzahl GCR immunreaktiver Zellen in den einzelnen Regionen und Zelltypen in den Darmabschnitten von Ebern und Kastraten ($\bar{x} \pm SD$)

			Duodenum	Jejunum	C. ascendens	C. descendens
Lamina propria	Zotte	Eber	117,5 ± 22,2	41,8 ± 8,8	184,5 ± 58,0	245,8 ± 71,0
		Kastrat	157,5 ± 31,4	188,0 ± 17,6	255,3 ± 31,0	246,0 ± 57,1
	Krypte	Eber	99,3 ± 9,4	32,3 ± 18,2	195,0 ± 64,0	243,0 ± 77,7
		Kastrat	148,8 ± 27,0	166,0 ± 17,9	250,5 ± 24,3	237,3 ± 61,9
Epithel	Zotte	Eber	78,6 ± 5,5	64,3 ± 3,4	54,7 ± 9,6	37,7 ± 5,2
		Kastrat	80,1 ± 2,5	76,7 ± 9,4	41,1 ± 2,5	48,7 ± 4,2
	Krypte	Eber	23,3 ± 4,3	14,0 ± 1,4	12,0 ± 2,2	8,3 ± 1,3
		Kastrat	19,8 ± 4,1	14,8 ± 3,6	8,8 ± 1,7	10,3 ± 1,0

GCR-Konzentration von proximal nach distal

Im Verlauf des Darms ist für Kastraten ein leichter Anstieg der GCR tragenden Zellen beginnend im proximalen Abschnitt in Richtung distal festzustellen. Dabei werden im Dickdarm fast doppelt soviel Rezeptoren nachgewiesen wie im Dünndarm. In der Ebergruppe weist das Jejunum die geringste Anzahl an GCR tragenden Zellen auf. Aber auch in dieser Gruppe kann ein Anstieg in distaler Richtung beobachtet werden.

Vergleich der GCR-Konzentration zwischen der Lamina propria und der Mucosa

In der *Kryptenregion* konnte bei Ebern in den Dünndarmabschnitten durchschnittlich etwa vier- ($p \leq 0,001$) und zweimal ($p \leq 0,05$) soviel GCR tragende Zellen in der Lamina propria (19,8 bzw. 6,5 %) wie in der Mucosa (4,6 bzw. 2,8 %) detektiert werden. Bei Kastraten sind im Duodenum (29,8 %) etwa siebenfach und im Jejunum (33,2 %) zehnfach mehr Zellen in der Lamina propria als in der Epithelschicht (4 und 3 %, $p \leq 0,001$). Im Dickdarm zeigen in der Lamina propria zwischen 39 und 50 % der Zellen eine GCR Färbereaktion. In beiden Gruppen sind bis zu 20fach weniger immunreaktive Zellen in der Epithelschicht (zwischen 1,6 und 2,4 %) gefärbt ($p \leq 0,001$).

In der *Zottenregion* stellt sich die Verteilung der GCR Färbung zwischen den Zelltypen anders dar. Im Duodenum der Eber befinden sich 1/3 (15,7 %) und im Jejunum 2/3 (12,8 %) der gefärbten Zellen in der Mucosaschicht. In den submucösen Bereichen konnte im Duodenum bei 23,5 % und im Jejunum bei 8,4 % der Zellen der GCR detektiert werden. Dieser Unterschied ist signifikant. Bei Kastraten finden sich im Duodenum (31,5 %) und Jejunum (37,6 %) etwa zweimal soviel immunreaktiven Zellen in der Lamina propria ($p \leq 0,001$). In den beiden Dickdarmabschnitten konnte sowohl bei den Ebern, als auch den Kastraten, etwa die fünffache Anzahl gefärbter Zeilen, im Vergleich zum Epithel (zwischen 7,5 und 10,9 %), in der Lamina propria (36,9 bis 51 %) festgestellt werden ($p \leq 0,001$).

GCR-Konzentration in der Krypten- und Zottenregion des Epithels

Innerhalb des Epithels liegt folgende Verteilung von immunreaktivem GCR vor. Generell befinden sich in der Epithelschicht im Darm sowohl bei Ebern als auch bei Kastraten durchschnittlich etwa 3/4 aller immunreaktiven Zellen (7,5 bis 16 %) in der Zottenregion ($p \leq 0,001$). Nur 1,6 bis 4,6 % der Epithelzellen in der Kryptenregion weisen eine Färbung auf.

GCR-Konzentration in der Krypten- und Zottenregion der Lamina propria

In der Lamina propria des Dünndarm und Dickdarms zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der GCR tragenden Zeilen in Bezug auf Krypten und Zottenregion. Eine Ausnahme stellt das Jejunum bei Kastraten dar, hier ist die Anzahl gefärbter Zellen in der Zottenregion um 13 % höher ($p \leq 0,01$).

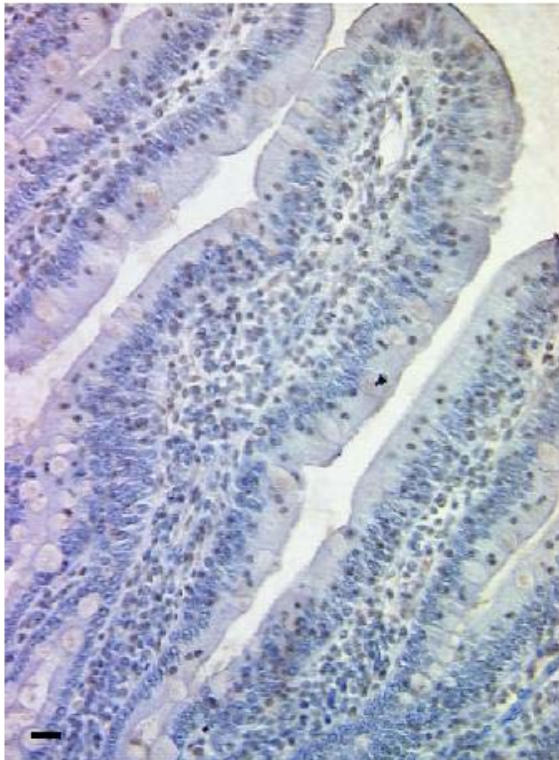
Vergleich zur GCR Expression bei Ebern und Kastraten

Der Vergleich der beiden Gruppen - Eber und Kastraten – ergibt folgendes Ergebnis: es besteht nur ein signifikanter Unterschied in der Anzahl GCR immunreaktiver Zellen in der Lamina propria. Im Duodenum sind in der Krypten- ($p \leq 0,001$) und auch in der Zottenregion ($p \leq 0,01$) bei Ebern etwa 10 % weniger immunreaktive Zellen zu verzeichnen als bei Kastraten. Im Jejunum ist derselbe Effekt, allerdings wesentlich ausgeprägter, zu beobachten. Hier sind in der Krypte und Zotte jeweils etwa 30 % weniger immunreaktive Zellen bei Ebern zu beobachten ($p \leq 0,001$). Im Dickdarm können keine signifikanten Unterschiede im Colon ascendens sowohl in der Krypten- als auch Zottenregion beobachtet werden. Auch im Colon descendens ist in der Lamina propria keine Unterscheidung zwischen Ebern und Kastraten erkennbar.

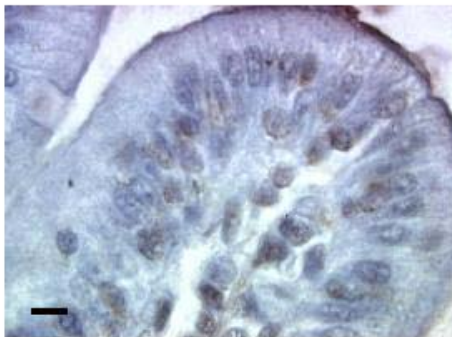
Beispielhaft ist von beiden Gruppen und den jeweiligen Darmabschnitten die Immunoperoxidase Färbung dargestellt (Abbildung 52 – 59).

Tabelle 9: Verteilung der GCR gefärbten Zellen im Dünndarm und Dickdarm von Ebern und Kastraten (4 Tiere je Gruppe) in der Zotten- und Kryptenregion der Lamina propria und des Epithelsaums

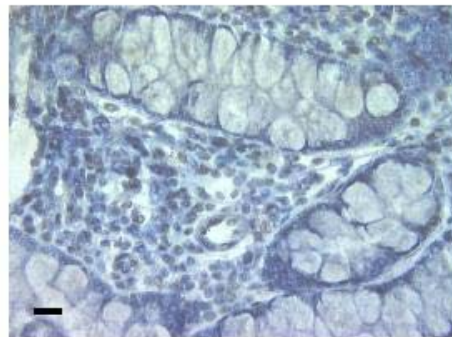
	Eber				Kastraten			
	Epithel		Lamina propria		Epithel		Lamina propria	
	Krypte	Zotte	Krypte	Zotte	Krypte	Zotte	Krypte	Zotte
D u o d e n u m	23,3	78,6	99,3	117,5	19,8	80,1	148,8	157,5
	***		ns		***		ns	
	***				***			
	**				***			
	ns				***			
	ns				**			
	ns				***			
	ns				**			
J e j u n u m	14,0	64,3	32,3	41,8	14,8	76,7	166,0	188,0
	***		ns		***		**	
	*				***			
	**				***			
	ns				***			
	ns				***			
	ns				***			
C. a s c e n d e n s	12,0	54,7	195,0	184,5	8,8	41,1	250,5	255,3
	***		ns		***		ns	
	***				***			
	***				***			
	ns				***			
	ns				ns			
	ns				ns			
	ns				ns			
C. d e s e n d e n s	8,3	37,7	243,0	245,8	10,3	48,7	237,3	246,0
	ns		ns		ns		ns	
	***				***			
	***				***			
	ns				***			
	ns				ns			
	ns				ns			
	ns				ns			
	ns				ns			



a)
Immunoreaktiver GCR wurde
in den Zellkernen der Lamina
propria und der Mucosa
detektiert.
20fache Vergrößerung
Balken entspricht 25 μm

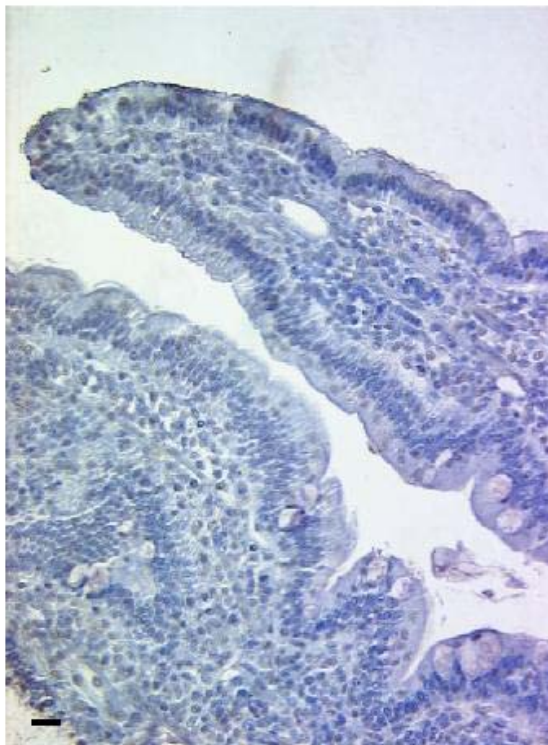


b)
Schwache GCR Kernfärbung der
Epithelzellen der Zottenspitze
100fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μm

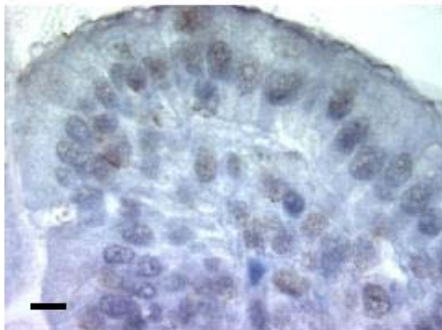


c)
Vereinzelte GCR Färbung der
Zellen der Lamina propria in der
Kryptenregion.
40fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μm

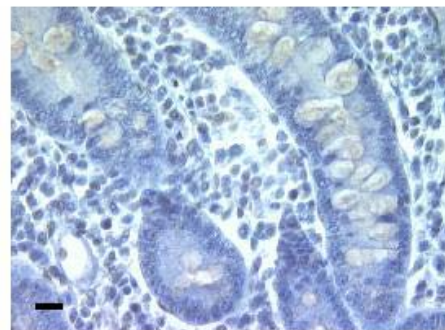
Abbildung 52: Immunoperoxidase Färbung des GCR im Duodenum von Ebern im histologischen Überblick und Detailaufnahmen aus der basalen und apikalen Kryptenregion



a)
Immunreaktion der Anti-
pGCR-IgG vorwiegend an
der Zottenspitze. Färbung
subepithelialer und
epithelialer Zellen.
20fache Vergrößerung
Balken entspricht $25\ \mu\text{m}$

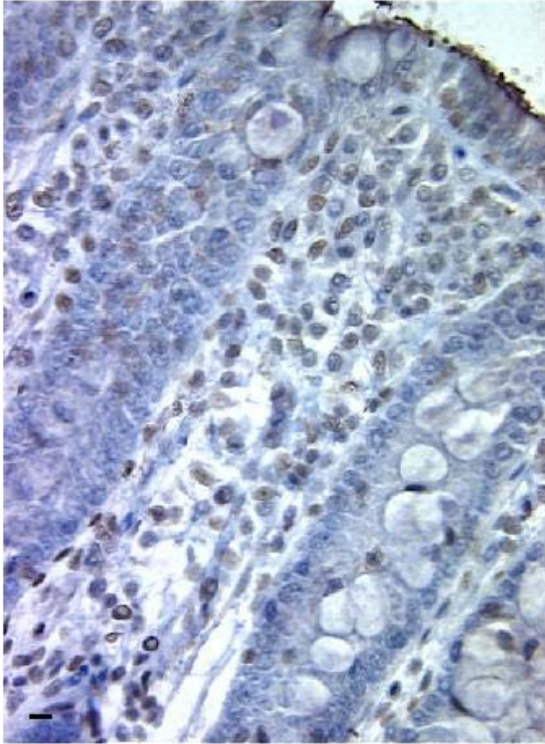


b)
GCR Kernfärbung der Epithelzellen
der Zottenspitze.
100fache Vergrößerung
Balken entspricht $10\ \mu\text{m}$

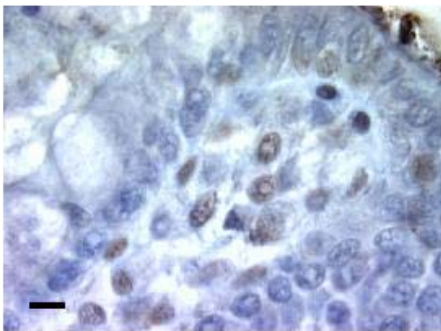


c)
Keine Immunreaktion in der
Kryptenregion erkennbar.
40fache Vergrößerung
Balken entspricht $10\ \mu\text{m}$

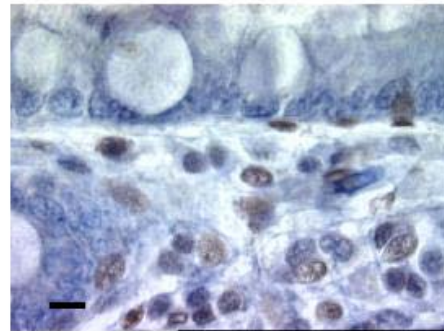
Abbildung 53: Immunoperoxidase Färbung des GCR im Jejunum von Ebern im histologischen Überblick und Detailaufnahmen aus der basalen und apikalen Kryptenregion



a)
Immunoreaktiver GCR wurde vorwiegend in den Zellkernen der Lamina propria detektiert. Färbung einzelner IEC. 40fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μ m

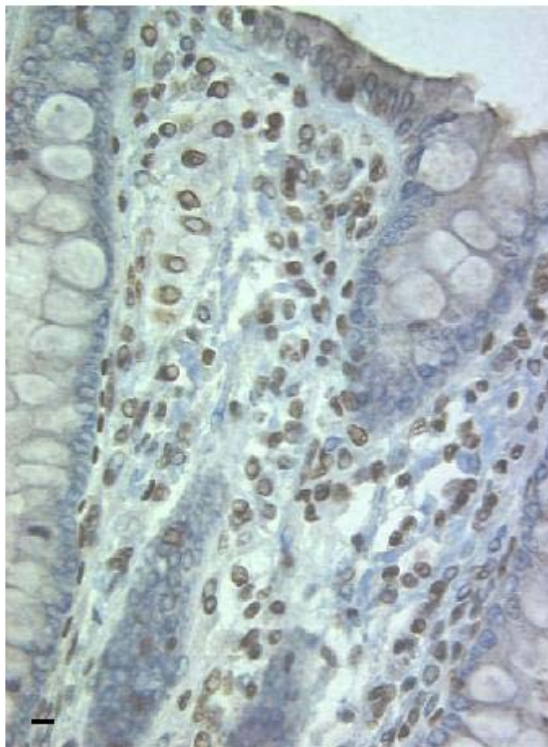


b)
Vereinzelte schwache intraepitheliale GCR Färbung der Mucosaoberfläche zwischen den Krypten
100fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μ m

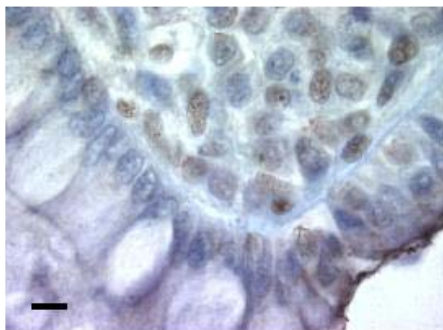


c)
GCR Färbung der Zellen der Lamina propria in der basalen Kryptenregion. Keine Färbung intraepithelialer Zellen
100fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μ m

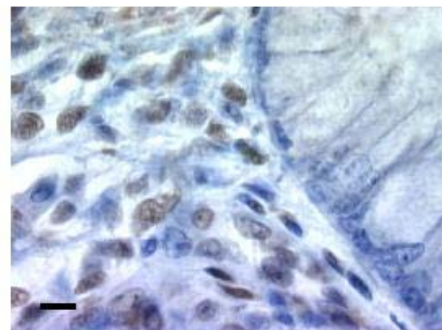
Abbildung 54: Immunoperoxidase Färbung des GCR im proximalen Colon von Ebern im histologischen Überblick und Detailaufnahmen aus der basalen und apikalen Kryptenregion



a)
Immunoreaktiver GCR wurde vorwiegend in den Zellkernen der Lamina propria detektiert.
40fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μm

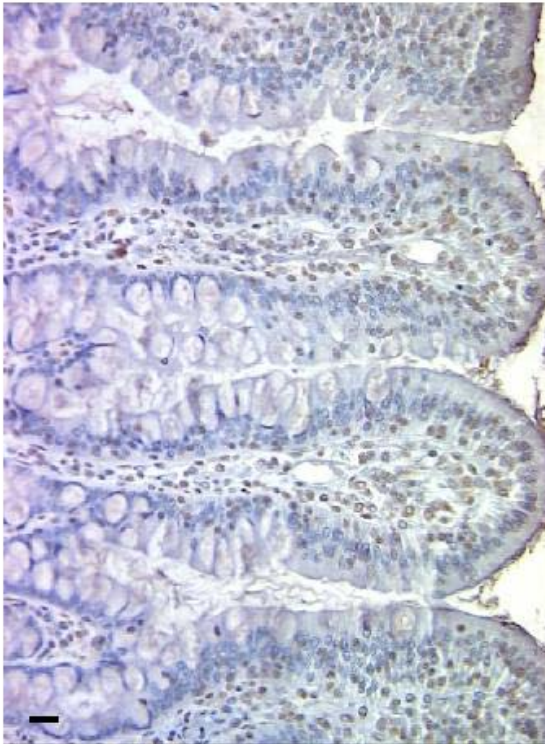


b)
Vereinzelte intraepitheliale GCR
Färbung der Mucosaoberfläche zwischen den Krypten
100fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μm

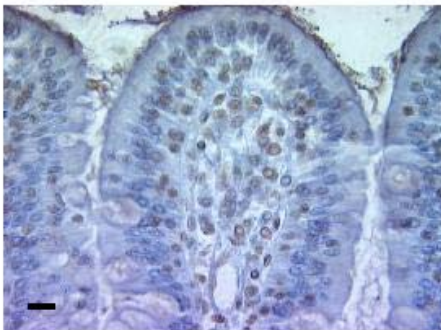


c)
GCR Färbung der Zellen der Lamina propria in der basalen Kryptenregion.
Keine Färbung intraepithelialer Zellen
100fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μm

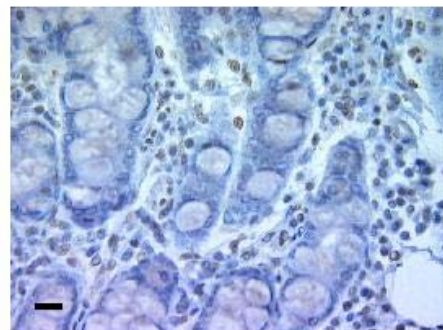
Abbildung 55: Immunoperoxidase Färbung des GCR im distalen Colon von Ebern im histologischen Überblick und Detailaufnahmen aus der basalen und apikalen Kryptenregion



a)
Immunoreaktiver GCR wurde
in den Zellkernen der Lamina
propria und der Mucosa
detektiert.
20fache Vergrößerung
Balken entspricht 25 μm

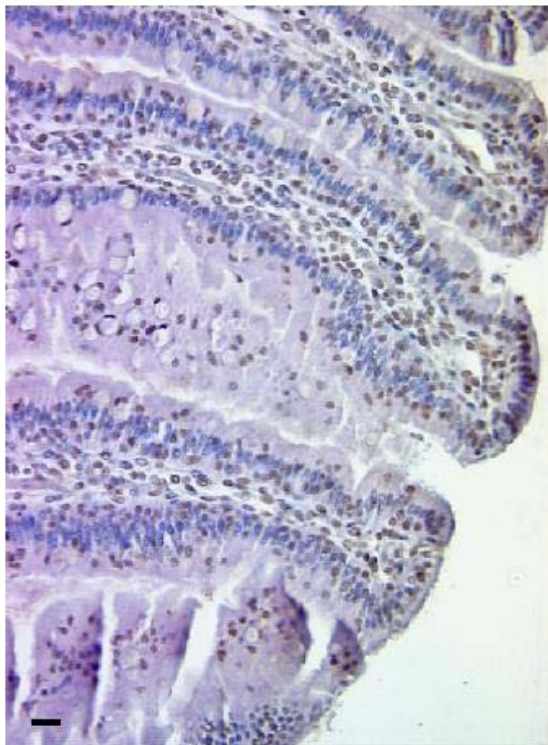


b)
GCR Kernfärbung der Epithel- und
Subepithelzellen an der Zottenspitze
40fache Vergrößerung
Balken entspricht 20 μm

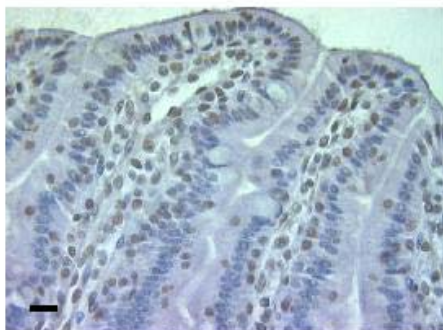


c)
GCR Färbung der Zellen der Lamina
propria in der Kryptenregion.
40fache Vergrößerung
Balken entspricht 20 μm

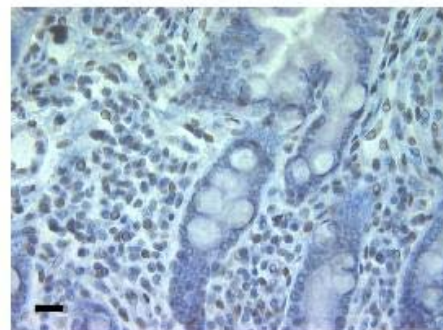
Abbildung 56: Immunoperoxidase Färbung des GCR im Duodenum von Kastraten im histologischen Überblick und Detailaufnahmen aus der basalen und apikalen Kryptenregion



a)
Starke Immunfärbung der
Nuclei der Lamina propria
und Intraepithelialer Zellen.
An der Zottenspitze
ausgeprägte Färbung der
Epithelzellen.
20fache Vergrößerung
Balken entspricht 25 μm



b)
GCR Kernfärbung der Epithelzellen
der Zottenspitze und anderer
intraepithelialer und subepithelialer
Zellen
40fache Vergrößerung
Balken entspricht 20 μm

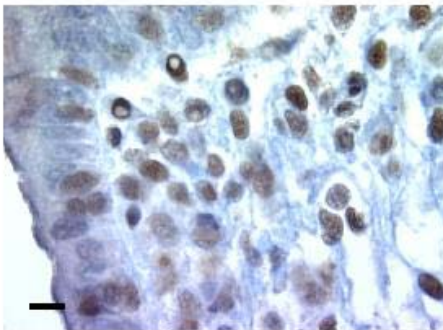


c)
GCR Färbung der Zellen der Lamina
propria in der Kryptenregion.
40fache Vergrößerung
Balken entspricht 20 μm

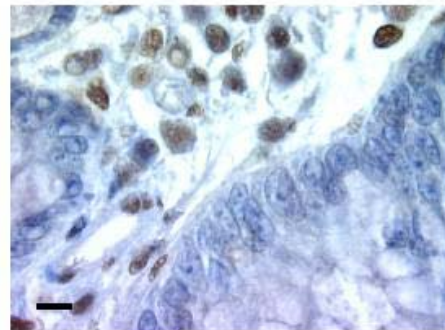
Abbildung 57: Immunoperoxidase Färbung des GCR im Jejunum von Kastraten im histologischen Überblick und Detailaufnahmen aus der basalen und apikalen Kryptenregion



a)
GCR Färbung der Zellkerne
der Lamina propria und der
Mucosa, vor allem im
Epithelsaum zwischen den
Krypten.
20fache Vergrößerung
Balken entspricht 25 μm

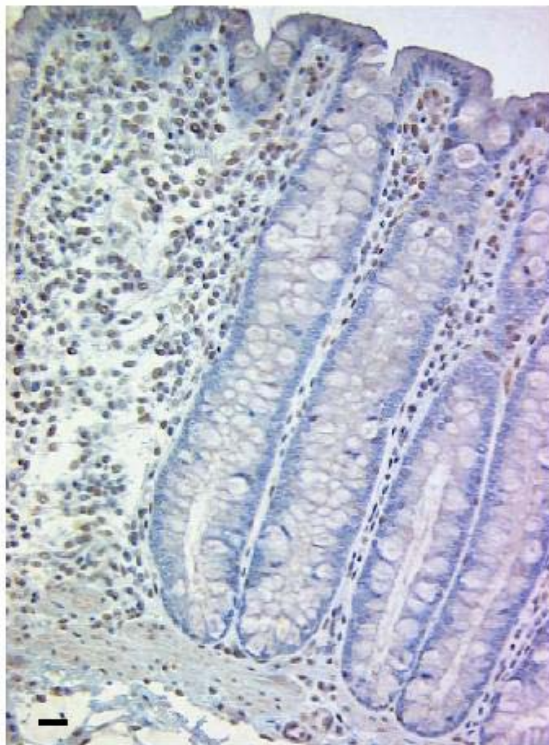


b)
GCR Kernfärbung der Saumzellen des
Epithels
100fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μm

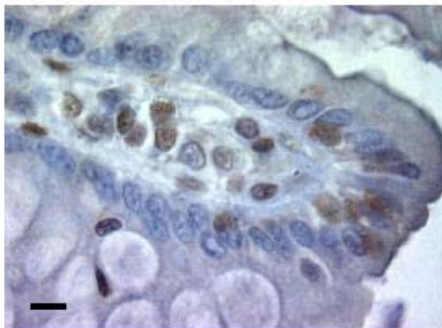


c)
Starke GCR Färbung der
Zellen der Lamina propria in der
basalen Kryptenregion.
100fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μm

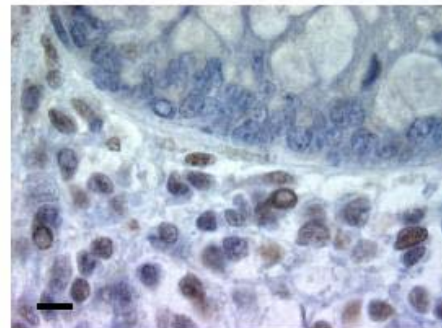
Abbildung 58: Immunoperoxidase Färbung des GCR im proximalen Colon von Kastraten im histologischen Überblick und Detailaufnahmen aus der basalen und apikalen Kryptenregion



a)
Immunoreaktiver GCR wurde
in den Zellkernen der Lamina
propria und der Mucosa
detektiert.
20fache Vergrößerung
Balken entspricht 25 μm



b)
Schwache GCR Kernfärbung der
Epithelzellen der Zottenspitze
100fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μm



c)
Vereinzelte GCR Färbung der
Zellen der Lamina propria in der
Kryptenregion.
100fache Vergrößerung
Balken entspricht 10 μm

Abbildung 59: Immunoperoxidase Färbung des GCR im distalen Colon von Kastraten im histologischen Überblick und Detailaufnahmen aus der basalen und apikalen Kryptenregion

6 DISKUSSION

6.1 ZUR BEDEUTUNG DER VERFÜGBARKEIT EINES SCHWEINESPEZIFISCHEN GCR-ANTISERUMS

Aufgrund der Schlüsselrolle der Glucocorticoide in der Regulation des Stoffwechsels und des Mitose-Apoptose-Gleichgewichts ist die Verfügbarkeit von Antikörpern, die gegen den Rezeptor gerichtet sind, eine Voraussetzung, um gewebs- und zellspezifische Detailanalysen durchzuführen.

Bislang existierte kein schweinespezifisches Anti-pGCR-Antiserum, zudem reagieren z.B. gegen den humanen Rezeptor gerichtete Antikörper beim Schwein nicht, so dass die Bestimmung des Rezeptors beim Schwein nur über Hormonbindungsstudien möglich war (CLAUS et al., 1990). Diese Nachweismethode beschränkt sich jedoch auf den Liganden-freien, nicht aktivierten Rezeptor und erlaubt keinerlei Aussagen über die Lokalisierung innerhalb eines Gewebes. Über Hormonbindungsstudien können nur die cytoplasmatischen Rezeptorkonzentrationen erfasst werden. Der aktivierte, im Nukleus an DNA gebundene oder in Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren befindliche Rezeptor wird somit nicht detektiert. Physiologische *in vivo* Studien zur intrazellulären Verteilung des Rezeptors von unterschiedlicher Gewebetypen zeigten, dass in Anwesenheit des Liganden ein Großteil des Rezeptors im Kern lokalisiert ist, während Adrenalektomie zum Anstieg der cytoplasmatischen und Abfall der nukleären Rezeptoren führt (McGIMSEY et al. (1991). Dies bedeutet, daß im physiologischen System, also bei Anwesenheit von Glucocorticoiden, ein wesentlicher Teil des Rezeptors nicht über Bindungsstudien nachgewiesen werden kann. Zudem belegen Studien von PRATT (1993), dass sich auch der inaktivierte Rezeptor laufend zwischen dem Cytoplasma und dem Kern hin- und herbewegt. Dabei erfolgt das Reassembling des aktivierten Rezeptors nach Hormonentzug zum HSP-assoziierten, hormonsensitiven Komplex sehr schnell, während die Umverteilung des Rezeptors in das Cytoplasma mit $t_{1/2} = 8-9$ h sehr langsam abläuft.

Ein weiterer Nachteil des Nachweises des GCR über Bindungsstudien ist die extreme Temperaturempfindlichkeit des Rezeptor-HSP-Komplexes. Ein leichter Temperaturanstieg bei der proteinanalytischen Aufarbeitung führt zur Dissoziation des Komplexes, wodurch der Rezeptor seine Hormonbindefähigkeit verliert (TOFT, 1993). Zudem können Cytosole aufgrund von Proteasen und der Abspaltung des HSP-Komplexes nur über einen begrenzten Zeitraum (3 Monate) gelagert werden.

GCR-Antiseren anderer Spezies sind aufgrund der gewählten, erkennenden antigenen Sequenzen, die teilweise im Bereich der DBD oder HBD liegen nicht für die Bestimmung des porcinen GCR geeignet; es ist evtl. eine hohe Kreuzreaktivität mit anderen intrazellulären Hormonrezeptoren zu erwarten. Wie gezeigt werden konnte, liegt in der DBD und HBD innerhalb der Familie der intrazellulären Hormonrezeptoren eine hohe Übereinstimmung vor. In eigenen Studien konnte der pGCR mit Anti-hGCR-AK (CIDLOWSKI et al., 1990), die gegen die AS 245-259 in der modulatorischen Region gerichtet sind, im Western Blot, bei der Immunpräzipitation und der IHC nicht nachgewiesen werden. Bereits der Austausch einer einzelnen Aminosäure innerhalb eines Epitops kann die Interaktion mit der Antigen-Bindungsstelle des Antikörpers stören (CLAASSEN et al., 1993). Andererseits detektieren andere Anti-humanGCR-Antikörper gegen die AS 150-175 und 346-367 gerichtet, den pGCR im Western Blot (WEAVER et al., 2000). Allerdings bestehen in diesen Regionen teilweise starke Abweichungen zwischen dem humanen und dem schweinespezifischen GCR. Daher bieten polyklonale Antikörper, die gegen ein großes Peptid gerichtet sind und somit verschiedenste Epitope erkennen und binden eine wesentlich höhere Affinität und Sensitivität. Die Wahl des Antigenfragments unterliegt jedoch sorgfältigen Überlegungen, um auch die Spezifität zu gewährleisten

6.2 MOLEKULARGENETISCHE ANALYSE DES PORCINEN GCR

Die Herstellung eines schweinespezifischen Antiserums gegen den GCR erforderte zuerst die Aufklärung der Nukleotidsequenz. Bislang waren vom porcinen GCR nur kurze Fragmente in der N-terminalen (SHARIF & MALLARD, 1995) und C-terminalen Region (PERREAU & MOISAN, 1997), sowie das 5' UTR Ende (KLEMCKE, 2000) sequenziert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein DNA Fragment, das für 703 AS des Rezeptors kodiert aufgeklärt. Die Größe vollständig sequenzierter GCR liegt zwischen 771 und 795 AS (HOLLENBERGER et al., 1985; MIESFELD et al., 1986; REYNOLDS et al., 1997; KEIGHTLEY & FULLER, 1994). Der Hauptteil (ca. 88%) des porcinen GCR ist somit sequenziert.

Ein 2,1 kb Fragment des porcinen GCR wurde mittels PCR amplifiziert und die Basenabfolge in fünf unabhängigen Klonen bestimmt. Wie aufgrund des vorangegangenen Speziesvergleichs zu erwarten war, zeigte die Sequenzanalyse der gebildeten Konsensusnukleotidsequenz, dass zwischen der modulatorischen Region des Rezeptors bei verschiedenen Spezies die geringste Übereinstimmung besteht, während die DBD und HBD eine identische bzw. hohe Übereinstimmung aufweisen. Gleiches spiegelt sich im Speziesvergleich der aus der Konsensusnukleotidsequenz abgeleiteten AS-Abfolge wieder. Vergleiche innerhalb einer Spezies zwischen den einzelnen Mitglieder der intrazellulären Hormonrezeptorfamilie sind für das Schwein nur begrenzt möglich, da hier bislang nur wenige Daten vorliegen. Immerhin sind Vergleiche mit dem porcinen

Östrogen-(ER) und Androgenrezeptor (AR) möglich. Wie zu erwarten, bestätigt sich, daß im Bereich der modulatorischen Region keine Übereinstimmung zwischen dem GCR-, dem porcinen AR (TRAKOOLJUL et al., 2000) und ER (BOKENKAMP, 1994) besteht, die zu Kreuzreaktionen des GCR-Antiserums führen könnten. Dies spielt auch eine entscheidende Rolle, zumal auch der AR und ER in verschiedensten Geweben wie z.B. dem Magen und dem Darm lokalisiert sind (WINBORN et al. (1987).

6.3 REKOMBINANTE EXPRESSION DES ANTIGENS UND HERSTELLUNG DES POLYKLONALEN ANTISERUMS

Aus der Sequenzanalyse geht hervor, dass sich die modulatorische Region aufgrund ihrer Rezeptorspezifität bestens für die Antigensynthese eignet. So verwendete z.B. auch McGIMSEY et al. (1991) zur Herstellung von Anti-Peptid-Antikörpern für immunhistochemische Untersuchungen bei Ratten zwei synthetisch hergestellte Fragmente aus der modulatorischen Region, die den AS 346-357 und 254-259 entsprechen. In der vorliegenden Arbeit wurde aus einem zur Konsensus-nukleotidsequenz homologen Klon ein 457 bp Fragment als Antigen für die Herstellung des polyklonalen Antiserums gewählt, das für einen Abschnitt der modulatorischen Region (pgcrrmr) kodiert. Unter Verwendung modifizierter Primer und eines Expressionsvektors wurde ein entsprechendes Konstrukt für die rekombinante Herstellung des Antigens gebildet. Im Vergleich zu TA-Klonierung garantiert die Ligation des Antigens über verschiedene Restriktionsschnittstellen einen richtungsorientierten Einbau in den Vektor und damit eine gesicherte Transkription. Das pGCRmr Peptid wurde über einen (nicht immunreaktiven) N-terminalen Histidin-Tag affinitätschromatographisch und mittels präparativer SDS-PAGE aufgereinigt und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Bei der Expression von Proteinen mit einem N-terminalen Histidin-Tag können auch kürzere Fragmente, durch fehlerhaften Abbruch der Transkription entstehen. Bei C-terminalen Histidin-Tags werden nur vollständig transkribierte Proteine aufgereinigt. Kürzere Fragmente sind für die Fragestellung der Synthese bzw. Spezifität von polyklonalen AK nicht von großer Bedeutung. Zumal wahrscheinlich auch das vollständig transkribierte pGCRmr Peptid nicht dieselbe Faltung wie im nativen Gesamtzeptormolekül, aufgrund der komplexen GCR-Struktur und des Faltungsmechanismus unter Beteiligung des HSP-Multiproteinkomplexes, einnimmt.

Das gewonnene Anti-pGCR-Antiserum wurde für Western blotting, Immunpräzipitation und Immunhistochemie charakterisiert. Anwendung fand es in einem Screeningversuch zur GCR Verteilung im Gastrointestinaltrakt des Schweins unter dem physiologischen Einfluss von Androgenen.

6.4 CHARAKTERISIERUNG DES POLYKLONALEN ANTISERUMS

Die Heterogenität zwischen den Spezies spielt für die immunogene Reaktion eine entscheidende Rolle. Über die AS-Sequenz des Kaninchen GCR liegen bislang jedoch keine Daten vor. Allerdings zeigten Sequenzvergleiche des GCR anderer Spezies (HOLLENBERGER et al., 1986; MIESFELD et al., 1986 ; DANIELSON et al., 1986 ; REYNOLDS et al., 1997; KEIGHTLEY & FULLER, 1994; GAO et al., 1994), dass die Liganden und Hormonbindungsdomäne stark konserviert sind, während die modulatorische Region eine erhöhte Variabilität aufweist. Weiterhin zeigt die Bestimmung antigener Determinanten aufgrund der verschiedenen Eigenschaften der Aminosäuren, dass vor allem in der Transaktivierungsdomäne eine hohe Anzahl antigener Regionen vorliegt. Allerdings weisen die unterschiedlich zugrunde gelegten Algorithmen unterschiedliche antigenwirkende Regionen aus. Dies spielt vor allem bei der Erzeugung von Peptidantikörpern (15-30 AS) eine Rolle. Bei der Herstellung von polyklonalen Antikörpern über große Peptide (100 AS) geben diese Analysen einen Anhaltspunkt, entscheidender sind jedoch hier Überlegungen bezüglich der Spezifität der ausgewählten Region.

Für die Charakterisierung der Immunreaktion bzw. des polyklonalen Anti-pGCR-Antiserums wurde zuerst die Reaktivität mit dem pGCRmr-Antigen im Western Blot überprüft. Neben dem etwa 15 kDa Fragment wurde eine schwache Bande von etwa 26 kDa detektiert, die jedoch mit zunehmender Verdünnung nicht mehr erkennbar war. Dabei könnte es sich um ein pGCRmr-Dimer handeln, das nicht vollständig denaturiert wurde. Zumal dieses Protein auch mit einem Anti-His-Antikörper nachweisbar ist. Das Antiserum zeigt eine überaus hohe Sensitivität. Das pGCRmr Peptid kann bis in den Picogrammbereich detektiert werden.

Die Tauglichkeit des Antiserums zur Detektion des physiologischen linearisierten Rezeptors wurde in cytosolischem Thymusprotein bestimmt. Der Thymus weist als extrem GC-sensitives Gewebe sehr hohe GCR-Konzentrationen (MILLER et al., 1990) auf und eignet sich daher gut zur Charakterisierung des Antiserums. Das Antiserum zeigt eine hohe Spezifität, wie durch kovalente Markierung des Rezeptors mit radioaktivem Ligand gezeigt werden konnte. Neben eines etwa 87 kDa Proteins treten kleiner Banden bei 75,8 und 68,4 kDa auf, dabei handelt es sich evtl. um proteolytische Spaltprodukte (TOFT, 1993), zumal deren Färbung durch kompetitive Hemmung mit pGCRmr Peptid unterbunden werden kann. Unter Verwendung des Präimmunsersums werden keine Signale detektiert. Andererseits detektierten SAOUD & WOOD (1996) bei fetalen Schafen mit einem Peptid-Antikörper (AS 346-367) zwei Glucocorticoidrezeptoren, in Form eines 97 kD und eines 45 kD Proteins. Dabei scheint ein Zusammenhang zwischen der fortschreitenden Entwicklung des Fetus und dem Ansteigen des 45 kDa GCRs zu bestehen.

Auch zeigt das Anti-pGCR-IgG eine hohe Sensitivität, wie anhand einer Verdünnungsreihe mit Thymusprotein gezeigt werden konnte. Für physiologische Untersuchungen der Rezeptorkonzentration im Gewebe wurde eine Optimierung der Antikörperkonzentration für Thymus- und Colongewebe durchgeführt. Auch hier zeigt sich der hohen Antikörpertiter. Bis zu einer 1:4000 Verdünnung der IgG Fraktion können zwei Fragmente von 87 und 68,4 kDa im Thymuscytosol spezifisch nachgewiesen werden. Detektierte Proteinfragmente kleiner 44 kDa wurden unspezifisch gebunden, wie der Reaktionsansatz zeigt, dem eine Inkubation der Antikörper mit kompetitivem pGCRmr vorausging. Der Ansatz mit Präimmunserum zeigt keine Reaktion mit Proteinen des Thymuscytosols. Auch beim Colonycytosol erbringt das Antiserum bis zu einer Verdünnung von 1:4000 ein schwaches Signal der pGCR spezifischen Bande bei ca. 87 kDa. Auch hier können kleinere Proteinfragmente als Spaltprodukte beschrieben werden, da diese bei der kompetitiven Blockierung des Antiserums mit pGCRmr Peptid und mit Präimmunserum nicht detektiert werden können.

Die Etablierung der Verwendung des Anti-pGCR-Antiserums für die Immunhistochemie wurde an Thymusgewebsschnitten durchgeführt. Die Spezifität wurde durch Präinkubation des Antiserums mit Proteinen wie Insulin und IGF-I, durch kompetitive Hemmung mit dem pGCRmr Peptid und durch den Nachweis unspezifischer Bindung mit dem Präimmunserum untermauert. Weiter bestätigt wurde die Tauglichkeit des Antiserums für die IHC durch Immunpräzipitationsversuche. Die Ergebnisse zeigen, dass der GCR in seiner nativen Form, sowohl im aktivierten, also hormonegebunden als auch im inaktivierten Zustand, ohne Ligandenbindung, als Multiproteinkomplex erkannt wird. Während mit steigender NaCl-Konzentration im Ansatz des liganden- gebundenen Rezeptors das etwa 90 kDa Protein spezifisch nachgewiesen werden kann, zeigt der Ansatz ohne Dexamethason Vorinkubation eine schwächere aber spezifische Färbung des 90 kDa GCR-Proteins bei geringer NaCl-Konzentration, während mit zunehmender NaCl-Konzentration verstärkt zwei Banden mit 90 und 68 kDa detektiert werden. Dies ist evtl. auf die Abspaltung des HSP-Komplexes unter hohen Salzkonzentrationen und damit die bessere Zugänglichkeit der Epitope in der modulatorischen Region zurückzuführen.

6.5 REZEPTORVERTEILUNG IM GASTROINTESTINALTRAKT UNTER DEM EINFLUSS VON ANDROGENEN

In der vorliegenden Arbeit wurde die GCR Verteilung im Intestinaltrakt von Schweinen untersucht. Der Darm mit seinen enormen adaptiven Fähigkeiten, benötigt ein feinabgestimmtes Regulationsprinzip zur Steuerung von Mitose und

Apoptose um ein homöostatisches Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Während Mitose bei reduzierter Apoptose zu Proliferation bis zur Hyperproliferation des Gewebes führen kann, resultiert eine verminderte Mitoseaktivität bei erhöhter Apoptose in der Atrophie des Gewebes. An der Regulation dieses Gleichgewichts sind Glucocorticoide beteiligt (SENGUPTA et al., 2000; KOFLER, 2000). So besteht zwischen der fraktionellen Proteinsyntheserate, einem Maß für die stattfindenden Umbauprozesse, und der GC-Konzentration eines Gewebes eine Korrelation. CLAUS et al. (1996) belegen dies durch Untersuchungen in Geweben mit hoher (Darm) und geringer (Muskel) fraktioneller Proteinsyntheserate. Im Darm beträgt die GCR-Konzentration ein 5-7 faches der Konzentration im Muskel, wobei die fraktionellen Proteinsyntheseraten für das jeweilige Gewebe bei 44 % und 3,5 bis 4,4 % liegen. Auch eigene Untersuchungen bei adulten und juvenilen Schweinen zeigten, dass hier im Vergleich die GCR-Konzentration im Intestinaltrakt bei Ferkeln im Alter von 3 Wochen ca. 7mal höher ist als bei adulten Tieren (nicht publiziert). Dies begründet sich in den Reifungs- und Entwicklungsvorgängen die zu diesem Zeitpunkt stattfinden (HENNING et al., 1994; SANGILD et al., 1995).

Die semiquantitative Bestimmung der GCR-Konzentration über Western Blotting und Densitometrie kann sowohl im Cytosol- als auch in der Kernfraktion im Dünn- und Dickdarm zwischen Kastraten und Ebern kein Unterschied festgestellt werden. Allerdings wurden Unterschiede in der intrazellulären Rezeptorverteilung in Abhängigkeit vom Darmabschnitt festgestellt. Im Ileum ist der Hauptanteil des Rezeptors im Kern lokalisiert, im Colon ist der Fall umgekehrt. Hier ist der Anteil des Rezeptors im Cytosol größer. Die Wirkung von Botenstoffen wird generell durch drei Mechanismen moduliert. Eine grobe Regulation erfolgt über die Sekretion des Hormons. Die gewebsspezifische Wirkung wird über eine unterschiedliche Rezeptorexpression in den Zielgeweben erreicht. Eine gewebstypische Feinregulation erfolgt über die Modifikation des Liganden. Zirkulierende GC erreichen jedes Organ, die organspezifische Reaktion wird durch die lokale Expression der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, welche entweder das aktive GC Cortisol in das inaktive Cortison oder Cortison in Cortisol umwandelt. Es existieren zwei Isoformen des Enzyms, Typ 1 und Typ 2. Typ 1 katalysiert die Umwandlung von Cortison in das aktive Cortisol. Es wird am stärksten in der Leber exprimiert und hält damit die für die Leber wichtigen GC-Konzentrationen aufrecht. Typ 2 schützt Gewebe vor einem Überschuss an aktivem Cortisol. In diesen Geweben erklären die Unterschiede in der Expression des Enzyms die individuelle Empfänglichkeit auf zirkulierende GC.

Für die Aufrechterhaltung des Salz/Wasserhaushalts und somit des Blutdrucks spielt die 11 β -HSD 2 im Colon aufgrund der Kreuzreaktivität des Aldosteronrezeptors mit Cortisol eine wichtige Rolle (CLAUS et al., 2001; HERMANS et al., 1999). CLAUS et al. (2001) untersuchten erstmals die 11 β -HSD

2 Expression im Intestinaltrakt des Schweins, im Colon war die Expression 10fach höher als im Ileum. Dies bedeutet, dass im Ileum der GCR durch zirkulierendes Cortisol aktiviert werden kann und somit in den Kern wandert. Im Colon dagegen wird die Wirkung des zirkulierenden GC durch enzymatische Inaktivierung aufgehoben, es steht kein Ligand zur Bindung zur Verfügung, der GCR bleibt inaktiv und verbleibt somit im Cytoplasma. Mittlerweile wurde auch die Sequenz der schweinespezifischen 11 β -HSD 2 geklärt (LANGE et al., 2001)

Andererseits wurden in der Lamina propria des Darms von Kastraten und Ebern erhöhte GCR-Konzentrationen im Colon festgestellt. Dies deutet evtl. auf eine Hochregulation der GCR-Expression aufgrund verminderter Ligandenverfügbarkeit hin. Während die Epithelzellen eine entgegengesetzte immunreaktive Färbung zeigen, hier ist die Färbung im Dünndarm stärker als im Dickdarm. Auch kann im Dünndarm eine hoch signifikante Unterscheidung zwischen Krypten und Zottenregion festgestellt werden. Der Rezeptor wird in Epithelzellen der Zottenspitze vermehrt exprimiert. Im Widerspruch dazu stehen die Untersuchungen von LENTZE et al. (1985) zur GCR-Verteilung in isolierten Zellen des intestinalen Epithels des Dünndarms. Mature Villuszellen an der Zottenspitze zeigten geringe und immature Kryptenzellen die höchsten GCR-Konzentrationen. Immature Kryptenzellen scheinen empfänglicher für die Modulation durch GC als mature Zellen der Zottenspitze. Dies spricht für die differenzierungsfördernde Wirkung der Glucocorticoide. Im Colon descendes ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kompartimenten vorhanden. Diese eigenen Untersuchungen und Ergebnisse unterstützen die These über das unterschiedliche Apoptose-Geschehen in den beiden Darmabschnitten. Im Dünndarm wird die Gewebemöostasis einerseits durch die Apoptose gealterter und geschädigter Zellen und andererseits durch die Apoptose der Stammzellenpopulation kontrolliert (RAAB et al., 1998; BOOTH & POTTEN, 2000). Auf diese Weise wird das Gewebe vor einer Tumorbildung geschützt. Im Dickdarm kann eine geringe Stammzellenapoptose der Mucosa z.T. für den wesentlich häufiger verbreiteten Dickdarmkrebs (SCHIRRMACHER, 1986) verantwortlich gemacht werden.

Der Einfluß der Zellen der Lamina propria bezüglich der Regulation des Mitose-Apoptose-Gleichgewichts zeigt sich in den Ergebnisse zur GCR-Immunreaktivität im Vergleich zur Epithelschicht. Im Dünndarm als auch im Dickdarm kann eine eindeutig höher GCR-Konzentration in der Lamina propria als in der Mucosa beobachtet werden, wobei dieser Effekt im Dickdarm wesentlich ausgeprägter ist.

Die signifikant geringeren GCR-Konzentrationen der Lamina propria im Dünndarm von Ebern im Vergleich zu Kastraten deuten auf eine Hemmung der GCR Genexpression durch Androgene hin. Im Gehirn beispielsweise wird die

Expression, die Bindungskapazität und die Rezeptoraffinität des GCR und des MR durch Östrogene beeinflusst. Androgene hingegen beeinflussen ausschließlich die GCR Expression (TURNER, 1997). Ein solcher regulatorischer Mechanismus von Gonadenhormonen ist auch im Gastrointestinaltrakt vorstellbar, zumal hinsichtlich der Nährstoffabsorption und Futtermittelverwertung geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Glucocorticoide sind entscheidend an der Regulation physiologischer Prozesse beteiligt. Effekte auf den Kohlenhydrat und Proteinstoffwechsel sind hinreichend bekannt, ebenso wie die immunsuppressive und anti-inflammatorische Wirkung pharmakologischer Dosierungen. Auf zellulärer Ebene spielen sie eine Schlüsselrolle in der Regulation von Differenzierungs- und Apoptosevorgängen. Diese Regulationsmechanismen sind vor allem in adaptiven Geweben, die sich in ihrer Funktion ständig an neue Anforderungen anpassen müssen, von enormer Bedeutung. Der Gastrointestinaltrakt ist eines der am stärksten beanspruchten Organe. Sowohl die Anpassung an veränderte Nahrungsverhältnisse, als auch die ständige Belastung mit einer Vielzahl an Antigenen, erfordert eine genau abgestimmte Regulation der Zellteilung, Differenzierung und Apoptose. Bei Schweinen konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in den Turnoverraten von Skelettmuskulatur und Darm den unterschiedlichen Glucocorticoidrezeptor (GCR) Konzentrationen zugeschrieben werden können. Dies erklärt zum Teil die gewebsspezifische Sensitivität auf zirkulierende Corticoide.

Studien zur GCR-Verteilung im Intestinaltrakt tragen daher zum Verständnis der Regulationsmechanismen bei. Bislang waren Rezeptorstudien beim Schwein nur über Bindungsstudien möglich. Nachteilig ist hierbei, dass in komplexen Gewebsstrukturen, wie z.B. dem Darm, die Rezeptoren nicht den verschiedenen Zelltypen zugeordnet werden können. Weiterhin ist über Bindungsstudien nur der Nachweis des nichtaktivierten Rezeptors möglich. Schweinespezifische Antikörper sind bislang nicht verfügbar. Vorversuche zeigten, dass gegen die modulatorische Region des humanen Rezeptors gerichtete Antikörper bei immunhistochemischer Anwendung und Western Blot Analyse den porcinen Rezeptor nicht binden. Gegen andere Rezeptorfragmente gerichtete Antikörper weisen teilweise erhebliche Kreuzreaktionen auf. Daher war es das Ziel der Untersuchungen, Antiseren gegen den Glucocorticoidrezeptor des Schweines zu erstellen. Teilarbeiten hierzu waren die Sequenzanalyse der cDNA des GCR und die Klonierung ausreichend großer Fragmente in rekombinanten Expressionssystemen. Darauf aufbauend sollten speziesspezifische Antikörper gegen Fragmente des Rezeptorproteins erzeugt werden.

Dazu wurde ein Fragment mit ca. 2,1 kb der GCR cDNA (*gcr2.1*) mittels PCR über Primer aus der modulatorischen und ligandenbindenden Region amplifiziert. Die Basenabfolge wurde mit Hilfe des Big Dye Terminator DNA Sequencing Kit analysiert. Aufgrund BLAST basierter Sequenzvergleiche, wurde für die rekombinante Expression des GCR-Antigens ein Proteinfolemling aus der modulatorischen Region (GCRmr) gewählt. Die kodierende Sequenz wurde amplifiziert und über addierte Restriktionschnittstellen als His-tag Fusionsprotein in

ein T7-Expressionssystem kloniert. Nach affinitätschromatographischer und präparativer Aufreinigung des Fusionproteins über Ni-NTA-Agarose und SDS-PAGE wurden Kaninchen immunisiert. Zur Charakterisierung des Kaninchen Anti-pGCR-Antiserums wurden folgende Fragestellungen geklärt: reagiert das polyklonale Antiserum mit dem Antigen, dem denaturierten GCR, dem nativen ligandengebundenen GCR und dem nativen inaktivierten GCR, der in Form eines Multiproteinkomplexes vorliegt. Die Spezifität des Antiserums wurde durch den Vergleich der Immunreaktivität von Präimmunserum, radioaktiver Markierung des Rezeptors, kompetitiver Hemmung mit dem pGCRmr Peptid und Vorinkubation des Antiserums mit artfremden Peptiden getestet. Praktische Anwendung fand das charakterisierte Antiserum in immunhistochemischen Studien zur Verteilung und Lokalisation des GCR im Dünn- und Dickdarm von Ebern und Kastraten. Die intrazelluläre Verteilung des GCR wurde mittels Western Blot Techniken untersucht.

Das *gcr2.1* Fragment kodiert für 2111 bp des porcinen GCR. Daraus leitet sich ein Proteinfragment mit 703 Aminosäuren ab, welches den größten Teil des Rezeptors repräsentiert. Für ausgeprägte immunogene Eigenschaften des Rezeptorantigens ist eine größtmögliche Abweichung zum Kaninchen GCR notwendig. Bislang liegen dazu keine Daten vor. Sequenzvergleiche mit dem humanen GCR zeigten jedoch, dass die modulatorische Region mit nur 85% Übereinstimmung die größte Abweichung zeigt, während DNA-Bindungsdomäne und Ligandenbindungsdomäne nur geringe Abweichungen aufweisen. Somit wurde ein 135 Aminosäuren umfassendes Fragment aus der modulatorischen Region rekombinant exprimiert. Diese Region wurde auch gewählt, um Kreuzreaktionen mit anderen Mitgliedern der Familie der intrazellulären Hormonrezeptoren auszuschließen. Beim Schwein ist keine Homologie innerhalb dieser Region mit anderen Rezeptoren festzustellen. Zudem sind DNA- und Hormonbindungsdomäne aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Aminosäuren weniger antigen, als die modulatorische Region.

Das Anti-pGCR-Antiserum bindet mit hoher Affinität das pGCRmr Antigen sowie den denaturierten Rezeptor im Western Blot. Immunpräzipitationsversuche zeigten, dass das Antiserum den nativen Rezeptor in seiner inaktivierten Form als Multiproteinkomplex gekoppelt an HSP90, als auch in seiner aktivierten Form mit abgespaltenem HSP90 bindet. Die Resultate der Immunpräzipitation bestätigen die Anwendbarkeit der Antikörper in der Immunhistochemie.

Bei Kastraten und Ebern kann in der Lamina propria ein Anstieg rezeptortragender Zellen von den proximalen Dünndarmbereichen Duodenum und Jejunum mit durchschnittlich 32,9 und 14,5% in Richtung distale mit 49,3 und 43,3% immunreaktive Zellen für Colon ascendens und C. descendens festgestellt werden. Die Immunfärbung der Epithelzellen zeigt bei beiden Tiergruppen ein umgekehrtes Muster wie in der Lamina propria. Durchschnittlich sind bei Kastraten

im Dünndarm 9,6% der Epithelzellen gefärbt, bei Ebern 9%. Im Dickdarm weisen nur 5,4 bzw. 5,6% der Epithelzellen eine Immunfärbung auf. Werden die beiden Gruppen - Eber und Kastraten - vergleichend betrachtet, zeigt sich, dass nur signifikante Unterschiede in der Anzahl GCR immunreaktiver Zellen in der Lamina propria zu beobachten sind. Im Duodenum sind bei Ebern etwa 10% weniger immunreaktive Zellen zu verzeichnen als bei Kastraten. Im Jejunum ist derselbe Effekt, allerdings wesentlich ausgeprägter, zu beobachten. Hier sind etwa 30% weniger immunreaktive Zellen. Im Dickdarm sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Der Anteil der GCR tragenden Zellen liegt bei Ebern zwischen 36,9 für das Colon ascendens und 49,2% für das Colon descendens und bei Kastraten zwischen 47,5 und 51%. Über die intrazelluläre Rezeptorverteilung können folgenden Aussage getroffen werden: in den einzelnen Darmabschnitten besteht zwischen Kastraten und Ebern sowohl in der Cytosol als auch in der Kernfraktion kein entscheidender Unterschied; im Ileum ist der Anteil des GCR im Cytosol kleiner als im Kern und im Colon ist der Anteil des GCR im Cytosol größer als im Kern.

8 SUMMARY

Glucocorticoids are well known to be essential for many physiological and developmental processes. Such functions include their effects on carbohydrate and protein metabolism and their regulatory influences on the immune system. In cell regulation they play a dose-dependent key role for differentiation and apoptosis. In rapidly renewing tissues the stringent control of these mechanisms is central to the maintenance of tissue homeostasis. In the gastrointestinal tract both the adaptation to changing nutrients and the presentation with a vast array of different types of antigens, including potential pathogens and harmless dietary antigens requires a granular regulation of cell proliferation, differentiation and cell death. In the pig, the differences in the turn-over rate for instance between skeletal muscle and the gut tissue could be attributed to different GCR concentrations respectively. This explains the tissue specific sensitivity on circulating corticoids.

Thus studies on GCR distribution contributes to the clarification of the role of glucocorticoids in the regulation of these mechanisms in the intestinal tract. In the pig, so far receptor detection has been performed by radio ligand binding assays, which only measures steroid unoccupied non-activated receptors in the cytoplasm. Selective GCR antibodies react with both occupied and unoccupied GCR. In addition, antibodies enable celltype specific detection of the GCR in complex tissues by immunocytochemistry. For the pig, antibodies against the GCR so far are not available. Own previous studies revealed, that antibodies raised against amino acids 245-259 of the human GCR are not able to bind to the porcine GCR in western blot assays and immunohistochemistry. Antibodies raised against other receptor fragments could show cross reactivity with other members of the intracellular hormone receptors. The aim of this investigation was the production of porcine GCR-specific polyclonal antibodies by detailed analysis of the cDNA sequence of the GCR and the recombinant expression of a suitable antigen fragment.

A fragment with 2.1 kb of the GCR cDNA (gcr2.1) was amplified by primers localized in the modulatory and ligand-binding domain. Sequencing was performed by the Big Dye Terminator DNA Sequencing Kit. Based on Blast sequence analysis a GCR antigen fragment for recombinant expression was selected from the modulatory region (GCRmr). The coding cDNA was amplified by PCR using modified primers and cloned in a T7-expression system as a His-tag fusion protein by added restriction sites. After affinity chromatographic and preparative purification of the fusion protein by Ni-NTA-Agarose and SDS-PAGE rabbits were immunized. For the characterization of the rabbit anti-pGCR-IgGs the following questions were examined: does the polyclonal antiserum bind the antigen, the denatured GCR, the native ligand activated GCR and the native inactivated GCR

as a multiprotein complex. The specificity of the antiserum was examined by comparison of the immunoreactivity of preimmuniserum, radioactive labeling of the receptor, competitive mit dem pGCRmr Peptid and preincubation of the antiserum with cognetive peptids. Praktische Anwendung fand das charakterisierte Antiserum in immunhistochemischen Studien of distribution and localization of the GCR in the small bowl and colon of boars and barrows. The intracellular distribution of the GCR was examined by western blot assays.

The 2111 bp gcr2.1 cDNA codes for a 703 amino acid fragment of the porcine GCR, which likely represents the main part of the porcine receptor. The heterology of the pGCR with the rabbit GCR is important for its immunogenic properties, but is not known to date. Sequence alignment with the human GCR shows the greatest variability in the modulatory region, revealing only 85% identity. The DNA-binding and hinge regions are either completely identical or at least highly conserved, showing a homology of 95% in the latter case. The ligand-binding domain reveals about 95% identity with the human sequence. For raising a specific antiserum against the porcine GCR, we subcloned a cDNA fragment of the receptor coding for 135 aminoacids of the modulatory region. We selected this region to avoid cross reactivity with other members of the family of intracellular hormone receptors. In this region the porcine GCR shows no homologie with other receptors like the androgen or estrogen receptor. In addition, the sequences of the DNA- and hormone-binding regions were less suited for raising antibodies due to their hydrophobic nature and accessibility.

The anti-pGCR-antibodies bind the pGCRmr antigen with high affinity, as well as the denatured receptor in western blot analysis. In addition, immunoprecipitation assays demonstrated that cytosolic GCR is recognized regardless of whether it is unoccupied or occupied with dexamethasone. Thus, the antiserum is able to bind the native GCR both in its inactivated form as a multiprotein complex in association with HSP90 or in its activated form with shed HSP 90. Our investigations with immunoprecipitation assays support the applicability of the anti-pGCR antiserum in immunohistochemistry.

Immunohistochemical studies showed an increased number of immunostained GCR in the colon compared with the small intestine, as has been shown earlier with ligand-binding assays. 32,9 % and 14,5 % of the cells of the lamina propria were GCR immunoreactive in the small intestine of barrows and boars. In the colon 49,3 % and 43,3% showed immunostaining. Epithelial cells showed a reversed pattern compared with the lamina propria in both groups with 9,6 % and 9 % in the small intestine and 5,4 and 5,6 % in the colon.

Comparison of both groups – barrows and boars - revealed significant differences in the number of GCR immunoreactive cells in the lamina propria of

the small bowel. Boars showed a decreased GCR expression of 10 % in the duodenum and 30 % in the jejunum. The number of GCR immunostained colonic cells amounts to 36,9 % in the colon ascendens and 49,2% in the colon descendens of boars and 47,5 % and 51 % in barrows.

The different subcellular GCR distribution in the two segments of the intestine can be explained by the increased expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 in the colon. 11 β -HSD 2 inactivates cortisol and thus inhibits receptor activation and thereby translocation to the nucleus.

9 LITERATURVERZEICHNIS

Akner G., Wikstrom A.C., Mossberg K., Sundquist K.G., Gustafsson J.A. (1994): Morphometric studies of the localization of the glucocorticoid receptor in mammalian cells and of glucocorticoid hormone-induced effects. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 645-657

Almawi W. Y. & Melemedjian O.K. (2002): Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leuco. Biol.* **71**, 9-15

Al-Mohaisen M., Cardounel A., Kalimi M. (2000): Repeated immobilization stress increases total cytosolic glucocorticoid receptor in liver. *Steroids* **65**, 8-15

Altschul, S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402

Antakly T., Thompson E.B., O'Donnell D. (1989): Demonstration of the intracellular localization and up-regulation of glucocorticoid receptor by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Cancer Res.* **49**, 2231s-2234s

Arriza J.L., Weinberger C., Cerelli G. et al. (1987): Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* **237**, 268-272

Baker A.R., McDonnell D.P., Hughes M. et al. (1988): Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3294-3298

Ballard P.L., Baxter J.D., Higgins S.J., Rousseau G.G., Tomkins G.M. (1974): General presence of glucocorticoid receptors in mammalian tissues. *Endocrinology* **94**, 998

Bamberger C.M., Schulte H.M., Chrousos G.P. (1996): Molecular Determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids.

Bantel H., Domschke W., Schulze-Osthoff K. (2000): Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance. *Gastroenterology* **119**, 1178-1179

- Baxter J.D. & Rousseau G.G. (1979):** Glucocorticoid hormone action: an overview. In: Glucocorticoid hormone action, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1-24
- Beato M., Herrlich P., Schütz G. (1995):** Steroid hormone receptors: many actors in search of a blot. *Cell* **83**, 851-857
- Berger et al (1996):** Analysis of glucocorticoid and mineralocorticoid signalling by gene targeting. *Endocr. Res* **22**, 641-652
- Berki. T., Kumánovics G., Kumánovics A., Falus A., Újhelyi E., Németh P. (1997):** Production and flow cytometric application of monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J. Immunol.Meth.* **214**, 19-27
- Berridge M.J. (1986):** Die Signalübertragung in der Zelle. In Krebs – Tumoren, Zellen, Gene. Hrsg.: Schramm V., Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, 90-101
- Blake M. et al. (1984):** A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphates-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal. Biochem.* **136**, 175-179
- Bodwell J.E., Webster J.C. Jewell C.M., Cidlowski J.A., Hu J..M., Munck A. (1998):** Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell-cycle dependence. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **65**, 91-99
- Böck P. (1989):** Romeis Mikroskopische Technik. Urban und Schwarzenberg, München
- Bokenkamp D., Jungblut P.W., Thole H.H. (1994):** The C-terminal half of the porcine estradiol receptor contains no post-translational modification: determination of the primary structure. *Mol. Cell. Endocrinol.* **104**, 163-172
- Bolt R.J., van Weissenbruch M.M., Lafeber H.N., Delemarre-van de Waal H.A. (2001):** Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr. Pulmonol.* **32**, 76-91
- Booth & Potten (2000):** Gut instincts: thoughts on intestinal stem cells. *J. Clin. Invest.* **105**, 1493-1499
- Bradford M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248

Bresnick E.H., Dalman F.C., Pratt W.B. (1990): Direct stoichiometric evidence that the untransformed M 300 000,)S, glucocorticoid receptor is a core unit derived from larger heteromeric complex. *Biochem.* **29**, 520-527

Brink M., Humbel B.M., De Kloet R., Van Driel R. (1992): The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. *Endocrinology* **130**, 3575-3581

Brönnegrad M., Reynisdottir S., Marcus C., Stierna P., Arner P. (1995): Effect of Glucocorticoid receptor expression in human adipocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 3608-3612

Burmester J.K., Maeda N., DeLuca H.F. (1988): Isolation and expression of rat 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1005-1009

Carson-Jurica M.A., Schrader W.T., O'Malley B.W. (1990): Steroid receptor family: structur and fuctions. *Endocr. Rev.* **11**, 201-220

Caron-Leslie L.A., Evans R.B., Cidlowski J.A. (1994): Bcl-2 inhibits glucocorticoid-induced apoptosis but only partially blocks calcium ionophore or cycloheximide-regulated apoptosis in S49 cells. *FASEB J.* **8**, 639-45

Carruth L.L., Jones R.E., Norris D.O. (2000): Cell denisty and intracellular translocation f glucocorticoid receptor-immunoreactive neurons in the kokanee salmon (*oncorhynchus nerka kennerlyi*) brain, with an emphasis on the olfactory system. *Gen Comp. Endocrinol.* **117**, 66-76

Chang C., Kokontis J., Liao S. (1988a) : Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* **240**, 324-326

Chang C., Kokontis J., Liao S. (1988b): Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7211-7215

Chinoy M.R., Chi X., Cilley R.E. (2001): Down-regulation of regulatory proteins for differentiation and proliferation in murine fetal hypoplastic lungs: altered mesenchymal-epithelial interactions. *Pediatr. Pulmol.* **32**, 129-141

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

Claassen E., Zegers N.D., Laman J.D., Boersma W.J. (1993): Use of synthetic peptides for the production of site (amino acid) specific polyclonal and monoclonal antibodies. *Year Immunol.* **7**, 150-61

Clark, J.M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9677-9686

Clarke A.R., Purdie C.A., Harrison D.J., Morris R.G., Bird C.C., Hooper M.L., Wyllie A.H. (1993): Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* **362**, 849-52.

Claus R., Raab S., Dehnhard M. (1996): Glucocorticoid receptors in the pig intestinal tract and muscle tissue. *Zentralbl Veterinarmed A.* **43**, 553-60.

Claus R. & Weiler U. (1996): Relationship between IGF-I, cortisol, and osteocalcin in peripheral plasma of growing pigs. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **104**, 344-349

Collingwood T.N., Urnov F.D., Wolffe A.P. (1999): Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J. Mol. Endocrinol.* **23**, 255-275

Cole T.J., Blendy J.A., Monaghan A.P., Schmid W., Aguzzi A., Schütz G. (1995): Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids* **60**, 93-96

Compton B.J. & O'Grady E.A. (1991): Role of charge suppression and ionic strength in free zone electrophoresis of proteins. *Anal Chem.* **63**, 2597-602.

Czar M.J., Owens-Grillo J.K., Dittmar K.D., Hutchison K.A., Zacharek A.M., Leach K.L., Deibel M.R., Pratt W.B. (1994): Characterization of the protein-protein interactions determining the heat shock protein (hsp90.hsp70.hsp56) heterocomplex. *J. Biol. Chem.* **269**, 11155-11161

Dahia P.L., Honegger J., Reincke M., Jacobs R.A., Mirtella A., Fahlbusch R., Besser G.M., Chew S.L., Grossman A.B. (1997): Expression of glucocorticoid receptor gene isoforms in corticotropin-secreting tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 1088-1093

Dahlman-Wight K., Almlöf T., McEwan I.J., Gustafsson J.A., Wright A.P.H. (1994): Delineation of small region within the major transactivation domain of the human glucocorticoid receptor that mediates transactivation of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1619-1623

Danielson M., Northrop J.P., Ringold G.M. (1986): The mouse glucocorticoid receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild-type and mutant receptor proteins. *EMBO J.* **5**, 2513-2520

DeCastro M., Elliot S., Kino T., Bamberger C., Karl M., Webster E., Chrousos G.P. (1996): The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol. Med.* **2**, 597-607

De-Lange P., Koper J.W., Brinkmann A.O., De Jong F.H., Lamberts S.W. (1999): Natural variants of the beta isoform of the human glucocorticoid receptor do not alter sensitivity to glucocorticoids. *Mol. Cell. Endocrinol.* **153**, 163-168

Demonacos C., Tsawdaroglou N.C., Djordjevic-Markovic R., Papalopoulou M., Galanpoulos V., Papadogeorgaki S., Sekeris C.E. (1993): Import of the glucocorticoid receptor into rat liver mitochondria in vivo and in vitro. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **46**, 401-413

Diederich S., Grossmann C., Hanke B., Quinkler M., Herrmann M., Bähr V., Oelkers W. (2000): In the search for specific inhibitors of human 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenases (11 β -HSD): chenodeoxycholic acid selectivity inhibits 11 β -HSD-1. *Eur. J. Endocrinol.* **142**, 200-207

Dittmar K.D., Banach M., Galigniana M.D., Pratt W.B. (1998): *J. Biol. Chem.* **273**, 7358-7366

Döcke (1996): Veterinärmedizinische Endokrinologie. (Döcke, F. edt.), G. Fischer Verlag Stuttgart - Jena

Evans R.M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895

Farman N. & Bocchi B. (2000): Mineralocorticoid selectivity: molecular and cellular aspects. *Kidney Int.* **57**, 1364-1369

Flach H., Kaiser U., Westphal H.M. (1992): Monoclonal antipeptide antibodies to the glucocorticoid receptor. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **42**, 467-474

Fraga S. (1982): Theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Can. J. Chem.* **60**, 2606-2610

Furness J.B., Kunze W.A.A. & Clerc N. (1999): Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am. J. Physiol.* **277**, G922-G928

Gametchu B., Watson C.S., Wu S. (1993): Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptors in cells from human leukemic patients. *FASEB J.* **7**, 1283-1292

Gao X., Kalkhoven E., Peterson-Maduro J., van der Burg B., Destree O.H. (1994): Expression of the glucocorticoid receptor gene is regulated during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta.* **1218**, 194-198

Garlick P.J., Millward D.J., James W.P.T., Waterlow J.C. (1975) : The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissue of the rat. *Biochim. Biophys. A.* **414**, 71-84

Gasc J.M., Delahaye F., Baulieu E.E. (1989): Compared intracellular localization of the glucocorticoid and progesterone receptors : an immunocytochemical study. *Exp. Cell Res.* **181**, 492-504

Geley S., Fiegl M., Hartmann B.L., Kofler R. (1997) : Genes mediating glucocorticoid effects and mechanisms of their regulation. In : *Reviews of Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Blaunstein M.P., Grunicke H., Habermann E., Pette D., Schultz G., Schweiger M., Springer Verlag, 1-97

Giguere et al. (1986): Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **46**, 645-652

Girogiono F. & Smith R.J. (1995) : Dexamethasone enhances insulin-like growth factor-I effects on skeletal muscle proliferation. *J. Clin. Invest.* **96**, 1473-1483

Godowski P.J., Picard D., Yamamoto K.R., (1988) : Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science* **241**, 812-6.

Green S., Walter P., Kumar V. et al. (1986) : Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**, 134-139

Gültekin H. und Heermann (1988): The use of PVDF membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* **172**, 320-329

Gutscher M. (1996): Die katabole Wirkung von Glucocorticoiden und die antikatabole Wirkung von Androgenen beim Schwein. Diplomarbeit

- Hache R.J., Tse R., Reich T., Syvory J.G., Lefebvre Y.A. (1999):** Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 1432-1439
- Heck S., Bender K., Kullmann M., Göttlicher M, Herrlich P., Cato A.C. (1997):** I kappa B alpha-independent downregulation of NF-kappa B activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **16**, 4698-4707
- Henning S., Rubin D., Shulmann R.J. (1994):** Ontogeny of the intestinal mucosa. In: *Physiology of the gastrointestinal tract.* L.R. Johnson (edt.), Raven Press, New York, Third Edit., 571-610
- Holbrook N.J., Martin G.R., Lockshine A. (eds.) (1996):** Cellular Aging and cell death. Whitey-Liss Inc. New York
- Hollenberger S.M., Weinberger C. Ong E.S. et al. (1985):** Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**, 635-641
- Hollenberger S.M., Giguere V., Segui P., Evans R.M. (1987):** Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell* **49**, 39-46
- Honda M., Orii F., Ayabe T., Imai S. Ashida T., Obara T., Kohgo Y. (2000):** Expression of glucocorticoid receptor beta in Lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistance ulcerative colitis. *Gastroenterology* **118**, 859-866
- Hopp T.P., Woods K.R. (1981):** Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **78**, 3824-8
- Hsu & Defranco (1995):** Selectivity of cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. *J. Biol. Chem.* **270**, 3359-3364
- Hu, G. (1993):** DNA polymerase-catalyzed addition of non-templated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol.* **12**, 763-770
- Hutchison K.A., Scherrer L.C., Czar M.J., Stancato L.F., Chow Y.H., Jove R., Pratt W.B. (1993):** Regulation of glucocorticoid receptor function through assembly of a receptor-heat shock protein complex. *Ann. NY Acad. Sci.* **684**, 35-48

- Iwanaga T., Hoshi O., Han H., Takahashi-Iwanaga H., Uchiyama Y., Fujita T. (1994):** Lamina propria macrophages involved in cell death (apoptosis) of enterocytes in the small intestine of rats. *Arch. Histol. Cytol.* **57**, 267-276
- Iwanaga T. (1995):** The involvement of macrophages and lymphocytes in the apoptosis of enterocytes. *Arch. Histol. Cytol.* **58**, 151-159
- Janin J. (1979):** A surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* **277**, 491-2
- Jeltsch J.M., Korozowski A., Quirin-Stricker C. et al. (1986):** Cloning of the chicken progesteron receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5424-5429
- Jenster G., Spencer T.E., Burcin M.M., Tsai S.Y., Tsai M-J., O'Malley B.W. (1997):** Steroid receptor induction of gene transcription: a two-step model *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 7879-7884
- Kamei Y., Xu L., Heinzl T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S.C., Heyman R.A., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G. (1996):** A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**, 403-414
- Keightley M.C. & Fuller P.J. (1994):** Unique sequence in the guinea pig glucocorticoid receptor induce constitutive transactivation and decrease steroid sensitivity. *Mol. Endocrinol.* **8**, 431-439
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972):** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-range implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257
- Kettler A., Wollenhaupt K., Einspanier R. (2000):** Expression in the porcine oviduct *Sus scrofa* mRNA for partial progesterone receptor (p4 receptor gene). GenBank Accession No. AJ245450
- Kiela P.R., Guner Y.S., Xu H., Collins J.F., Ghishan F.K. (2000):** Age- and tissue-specific induction of NHE3 by glucocorticoids in the rat small intestine. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**, C629-637
- Kobs, G. (1995):** pGEM-T Vector: cloning of motified blunt-ended DNA fragments. *Promega Notes* **55**, 28
- Kofler R. (2000):** The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem. Cell Biol.* **114**, 1-7

Kolke J.S., Sakai M., Muramatsu M. (1987): Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2499-2510

Krust A., Green S. Argos P. et al. (1986): The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erb-A and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* **5**, 891-899

Laemmli (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680

Landers & Spelsberg (1992): New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2**, 19-63

Laudet V., Hanni C., Coll J., (1992): Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO Journal* **11**, 1003-1013

Lazar M.A. (1991): Steroid and thyroid hormone receptors. In: *Steroid hormones: synthesis, metabolism and action in health and disease*, 681-695. WB Saunders, Philadelphia - Pennsylvania

Lee S.W., Tsou A.P., Chan H., Thomas J., Petrie K., Eugui E.M., Allison A.C., (1988): Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**, 1204-1208.

Lenzen S., Bailey C.J. (1984): Thyroid hormones, gonadal and adreno-cortical steroids and the function of the islets of Langerhans. *Endocr. Rev.* **5**, 411

Lind U., Greenidge P., Gillner M., Koehler K.F., Wright A., Carlstedt-Duke J. (2000): Functional probing of the human glucocorticoid receptor steroid-interacting surface by site-directed mutagenesis. Gln-642 plays an important role in steroid recognition and binding. *J. Biol. Chem.* **275**, 19041-19049

Loosfeld H., Atger M., Misrami M. et al. (1986): Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone receptor complementary DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9045-52

Lubahn D.B., Joseph D.R., Sullivan P.M., Willard H.F., French F.S., Wilson E.M. (1988): Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* **240**, 327-330

McDonnell D.P., Mangelsdorf D.J., Pike J.W., Haussler M.R., O'Malley B.W. (1987): Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* **235**, 1214-1220

McGimsey W.C., Cidlowski, Stumpf W.E., Sar M. (1991): Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain, pituitary, liver, thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinology*, **129**, 3064-3072

Miesfeld R., Rusconi S., Godowski P. et al. (1986): Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell* **46**, 389-399

Miesfeld R.L. (1990): Molecular genetics of corticosteroid action. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**, S11-7

Miller A.H., Spencer R.L., Pearce B.D., Pisell T.L., Azrieli Y., Tanapat P., Moday H., Rhee R., McEwen B.S. (1998): Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. *Cell. Immunol.* **186**, 45-54

Miller A.H., Spencer R.L., Stein M., McEwan B.S. (1990): Adrenal steroid receptor binding in spleen and thymus after stress or dexamethasone. *Am. J. Physiol.* **259**, E405-412

Miller W.L. & Tyrrel J. (1995): The adrenal cortex. In *Endocrinology and Metabolism*. Edited by Felig P., Baxter J.D., Frohman L.A., McGraw-Hills Inc. 555-711

Morale M.C., Batticane N., Gallo F., Barden N., Marchetti B. (1995): Disruption of hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in transgenic mice expressing type II glucocorticoid receptor antisense ribonucleic acid permanently impairs T cell function: effects on T cell trafficking and T cell responsiveness during postnatal development. *Endocrinology* **136**, 3949-1360

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-73

Munck A. & Brinck-Johnson T. (1967): Specific metabolic and physicochemical interactions of glucocorticoids in vivo and in vitro with rat adipose tissue and thymus cells. *Proceedings of the 2nd International Congress on Hormonal Steroids*. *Excerpta Medica Int. Cong. Ser.* **132**, 472-481

- Munck & Gurzre (1986):** Glucocorticoid physiology, pharmacology and stress
Adv. Exp. Med. Biol. **196**, 81-96
- Muzio M. (1998):** Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis.
Int. J. Clin. Lab. Res. **28**, 141-147
- Nielson V.H., Larsen N.J. (1997):** A three-allele PstI RFLP at the porcine
glucocorticoid receptor (GRL) gene. Animal Genetics **28**, 150-158
- Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1975):** Lehrbuch der Anatomie der
Haustiere, Band II, 112. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- Oakley R.H., Sar M., Cidlowski J.A. (1996):** The human glucocorticoid receptor
beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. J. Biol.
Chem. **271**, 9550-9
- Oakley R.H., Jewell C.M., Yudit M.R., Bofetiado D.M., Cidlowski J.A. (1999):**
The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor isoform.
Specificity and mechanisms of action. J. Biol. Chem. **274**, 27857-27866
- Okret S., Dong Y., Bronnegard M., Gustafsson J.A. (1991):** Regulation of
glucocorticoid receptor expression. Biochimie **73**, 51-59
- O'Malley B.W. (1990):** The steroid receptor superfamily: more excitement
predicted for the future. Molecular Endocrinol. **4**, 363-369
- O'Malley B.W. & Conneely O.M. (1992):** Orphan receptors: in search of a
unifying hypothesis for activation. Molecular Endocrinol. **D**, 1359-1361
- Orti E., Bodwell J.E., Munck A. (1992):** Phosphorylation of steroid hormone
receptors. Endocr. Rev. **13**, 105-128
- Orti E., Hu L.M., Munck A. (1993):** Kinetics of glucocorticoid receptor
phosphorylation in intact cells. Evidence for hormone-induced
hyperphosphorylation after activation and recycling of hyperphosphorylated
receptors. J. Biol. Chem. **268**, 7779-84
- Orth D.N. & Kovacs W.J. (1998):**
The adrenal cortex. In 517-608

- Ozawa H., Takao I., Ikuo O., Kawata M (1999):** Cellular localization and distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and the expression of glucocorticoid receptor messenger RNA in rat pituitary gland. A combined double immunohistochemistry study and in situ hybridization histochemical analysis. *Cell Tissue Res.* **295**, 207-214
- Perreau V. & Moisan M.P. (1997):** Sus scrofa mineralocorticoid receptor mRNA, partial cds. GenBank Accession No. U88893
- Petkovich M., Brand N.J., Krust A. Chambon P. (1987):** A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* **330**, 444-449
- Pimentel E. (1994):** Regulation of cell functions. In: Handbook of growth factors - general basic aspects. CRC Press, London-Tokyo, 1-42
- Podolsky D.K. (1994):** Peptid growth factors in the gastrointestinal tract. In: Physiology of the gastrointestinal tract. L.R. Johnson (edt.), Raven Press, New York, Third Edit., 129-167
- Potten C.S., Wilson J.W., Booth C. (1997):** Regulation and significance of apoptosis in stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* **15**, 82-93
- Powell C.E., Watson C.S., Gametchu B. (1999):** Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. *Endocrinol.* **10**, 271-280
- Pratt W.B. (1992):** Control of steroid receptor function and cytoplasmic nuclear transport by heat shock proteins. *BioEssays* **14**, 841-848
- Pratt W.B. (1993):** The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol. Chem.* **268**, 21455-21458
- Pratt W.B. & Dittmar K.D. (1998):** Studies with purified chaperones advance the understanding of the mechanism of glucocorticoid receptor-hsp90 heterocomplex assembly. *TEM* **9**, 244-252
- Pratt W.B. & Toft D.O. (1997):** Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**, 306-359
- Que F.G. & Gores G.J. (1996):** Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterol.* **110**, 1238-1243

Radoja N., Komine M., Jho S.H., Blumenberg M., Tomic-Canic M. (2000): Novel mechanism of steroid action in skin through glucocorticoid monomers. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4328-4339

Raiz L.G. & Fall P.M. (1990): Biphasic effects of prostaglandins E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: Interaction with cortisol. *Endocrinology* **126**, 1654-1659

Ramdas J., Liu W., Harmon J.M. (1999): Glucocorticoid induced cell death requires autoinduction of glucocorticoid receptor expression in human leukemic T cells. *Cancer Res.* **59**, 1378-1385

Ramsay T.G., White M.E. und Wolverton C.K. (1989): Glucocorticoids and the differentiation of porcine adipocytes. *J. Anim. Sci.* **67**, 2222-2229

Reddy G.V.P. (1994): Cell cycle: regulatory events in G1/S transition of mammalian cells. *J. Cel. Biochem.* **54**, 379-386

Refojo D., Libermann A.C., Holboer F. & Arzt E. (2001): Transkription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids. *Immunol. Cell. Biol.* **79**, 385-394

Reul J.M. & De Kloet E.R. (1985): Two receptor systems for corticosterone in rat brain : microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* **117**, 2505-2511

Reynolds P.D., Pittler S.J., Scammell J.G. (1997): Cloning and Expression of the Glucocorticoid receptor from the squirrel Monkey (*Saimiri boliviensis boliviensis*, a glucocorticoid-resistant primate). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 465-472

Rivers C., Levy A., Hancock J., Lightman S., Norman M. (1999): Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 4283-4286

Rousseau G.G. & Baxter J.D. (1979) : Glucocorticoid receptors. In: *Monographs on endocrinology: glucocorticoid hormone action* (Baxter J.D., Rousseau G.G., eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, 49-78

Ruckebusch Y., Phaneuf L.-P., Dunlop R. (1991): Hormones of the adrenal cortex and medulla, 534-541 The digestive system, 191-289, In: *Physiology of small and large animals*. B.C. Decker, Hamilton-Philadelphia

- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**, 5463-7
- Sangild P.T., Sjoström H., Noren O., Fowden A.L., Silver M. (1995):** The prenatal development and glucocorticoid control of brush-boarder hydrolases in the pig small intestine. *Ped. Res.* **37**, 207-212
- Sap J., Munoz A., Kamm K., et al. (1986):** The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* **324**,635-642
- Saoud C.J. & Wood C.E. (1996):** Developmental changes and molecular weight of immunoreactive glucocorticoid receptor protein in the ovine fetal hypothalamus and pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **229**, 916-921
- Schaeffer C., Diab-Assef M., Plateroti M., Laurent-Huck F., Reimund J.M., Kedinger M., Foltzer-Jourdainne C. (2000):** Cytokine gene expression during postnatal small intestinal development: regulation by glucocorticoids. *Gut* **47**, 192-199
- Schlaghecke R. (1992):** Glukokortikoidrezeptoren – Parameter der zellulären Wirkung endogener und synthetischer Glukokorticoide im menschlichen Organismus. Vieweg & Sohn, Braunschweig, Wiesbaden, Deutschland
- Schreck C.B. (1993):** Glucocorticoids: metabolism, growth and development
In: *The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates*, Academic Press Inc. 367-392
- Schulman G., Robertson N.M., Elfenbein B., Eneanya D., Litwack G., Basti C.P. (1994):** Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor steroid binding and localization in colonic cells. *Am. J. Physiol.* **266**, C729-C740
- Sekeris C.E. (1990):** The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In Vivo* **4**, 317-20
- Sengupta S. Vonesch J.L., Waltzinger C., Zheng H. Wasylyk B. (2000):** Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *EMBO J.* **19**, 6051-6064
- Shahidi H., Vottero A., Stratakis C.A., Taymans S.E., Karl M., Longui C.A., Chrousos G.P., Daughaday W.H., Gregory S.A. Plate J.M.D. (1999):** Imbalanced expression of the glucocorticoid receptor isoforms in cultured lymphocytes from a patient with systemic glucocorticoid resistance and chronic lymphocytic leukemia. *Biochim. Biophys. Res. Commun* **254**, 559-65

Sharp, P.A., Sugan, B. und Sambrook, J. (1973): Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**, 3055-63.

Shibata H., Spencer T. E., Onate S.A., Jenster G., Tsai S.Y., Tsai M-J., O'Malley (1997): Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Reg. Prog. Horm. Res.* **52**, 141-165

Simon O. (1989): Metabolism of proteins and amino acids. In: Protein metabolism in farm animals, H.D. Bock, B.O. Eggum, A.G. Low, T. Zerbrowska (edts). Oxford Sci. Publ., DLB, Berlin, 273-366

Simons S.S. (1994): Function/activity of specific amino acids in glucocorticoid receptors. *Vitamines and Hormones* **49**, 49-130

Smith D.F., Lubahn D.B., McCormick D.J., Wilson E.M., Toft D.O. (1998): The production of antibodies against the conserved cystein region of steroid receptors and their use in characterizing the avian progesterone receptor. *Endocrinology* **122**,2816-2825

Smith D.F. und Toft D.O. (1993): Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* **7**, 4-11

Snochowski M., Lundström K., Dahlberg E., Petersson H., Edquist L.E. (1981): Androgen and glucocorticoid receptors in porcine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* **53**, 80-90

Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130

Studier, F.W. Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. (1990): Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.

Tabor, S. und Richardson, C.C. (1985): A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1074-1078

Thompson E.B. (1994): Apoptosis and steroid hormones. *Mol. Endo.* **8**, 665-673

- Thun R. & Schwarz-Porsche D. (1994):** Nebennierenrinde. In: Veterinärmedizinische Endokrinologie. (Döcke, F. ed.), G. Fischer Verlag Stuttgart - Jena, 309-346
- Trapp T., Rupprecht R., Castren M., Reul J.M., Holsboer F. (1994):** Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* **13**, 1457-1462
- Trapp T. & Holsboer F. (1996):** Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 145-149
- Tronche F., Kellendonk C., Reichhardt H. & Schütz G. (1998):** Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Current Opinion in Genetics & Development* **8**, 532-538
- Truss M. & Beato M (1993):** Steroid hormone receptors: interaction with desoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr. Rev.* **14**, 459-479
- Tsai M.-J., O'Malley B.W. (1994):** Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451-486
- Turnbull A.V. & Rivier C.L. (1999):** Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiological Reviews* **79**, 1-71
- Turner B.B. (1997):** Influence of gonadal steroids on brain corticosteroid receptors: a minireview. *Neurochem. Res.* **22**, 1375-1385
- Vanderbilt J.N., Miesfeld R., Maler B.A., Yamamoto K.R. (1987):** Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity. *Mol. Endocrinol.* **1**, 68-74
- Weiler I.J., Lew D., Shapiro D.J. (1987):** The *Xenopus laevis* estrogen receptor: sequence homology with human and avian receptors and identification of multiple estrogen messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.* **1**, 355-363
- Weinberger C., Thompson C.C. Ong E.S. et al. (1986):** The *c-erb-A* gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* **324**, 641-648
- Welling G.W., Weijer W.J., van der Zee R., Welling-Wester S. (1985):** Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* **188**, 215-8.

Wikström A.C., Bakke O., Okret S., Brönnegård M., Gustafsson J.A. (1987): Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: evidence for cytoplasmic and nuclear localization. *Endocrinology* **120**, 1232-1242

Williams G.R. & Franklyn J.A. (1994): Physiology of the steroid-thyroid hormone nuclear receptor family. *Baillière's Clin. Endocr. Metab.* **8**, 241-266

Winborn W.B., Sheridan P.J., McGill H.G. (1987): Sex steroid receptors in the stomach, liver, pancreas, and gastrointestinal tract of the baboon. *Gastroenterology* **92**, 23-32

White E. (1993): Death-defying acts: a meeting review on apoptosis. *Genes & Development* **7**, 2277-2284

Wright (1997): Stem cell repertoire in the intestine. *Stem cells* (ISBN 0-12-563455-2), Academic Press Ltd. 315-329

Wyllie A.H. (1981): Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: *Cell death in biology and Pathology* (Bowen I.D., Lockshin R.A. eds.), Chapman and Hall, New York, 9-34

Zhou, M.Y., Clark, S.E. und Gomez-Sanchez, C.E. (1995): Universal cloning method by TA strategy. *Bio Techniques* **19**, 34

DANKSAGUNG

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Claus für die Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit am Fachgebiet für Tierhaltung und Leistungsphysiologie sowie die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen.

Prof. Dr. M. Müller und Prof. Dr. Dr. G. Brem danke ich besonders für die kooperative Zusammenarbeit bei der Durchführung der molekulargenetischen Analysen und die Arbeitsmöglichkeit am Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien.

Herzlichsten Dank an Frau Dr. Sabine Müller für die hervorragende Betreuung der Arbeit in Wien. Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern/innen für die Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima.

Ein großes Dankeschön an alle nicht namentlich erwähnten Kollegen/innen und Mitarbeiter/innen des Instituts für Tierhaltung und Tierzucht, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in jeder Weise in meiner Arbeit unterstützte, und es mir dadurch ermöglichte meinen eigenen Weg zu gehen.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Landesforschungsschwerpunktes danke ich dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst, Baden-Württemberg.