

Charakterisierung Testosteron-bindender Proteine in RAW
264.7 Makrophagen

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von
Nadine Tillmanns
aus Mönchengladbach

Düsseldorf 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Koreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.05

*Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge so sind,
wie sie sind.*

Aristoteles

Inhaltsverzeichnis

1.0	Einleitung	1
1.1	Androgene	1
1.2	Klassische Steroidwirkung	2
1.3	Der klassische Androgenrezeptor	4
1.4	Nicht-genomische Effekte	6
1.5	Zielsetzung der Arbeit	12
2.0	Material und Methoden	15
2.1	Enzyme und Chemikalien	15
2.2	Lösungen und Puffer	18
2.3	Zellkulturlinien	23
2.4	Bakterienstämme	23
2.5	Screening-Konjugate	23
2.6	Antikörper	23
2.6.1	Primäre Antikörper	24
2.6.2	Sekundäre Antikörper	24
2.7	Synthetische Oligonukleotide	24
2.8	Versuchstiere	26
2.9	Probenvorbereitung	26
2.9.1	Organentnahme	26
2.10	Molekularbiologische Methoden	26
2.10.1	Isolation von Gesamt-RNA mittels peqGOLD TriFAST™	26
2.10.2	Isolation von Poly(A) ⁺ RNA	27
2.10.3	Expressionsanalyse: RT-PCR	28
2.10.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.10.5	Auftrennung von RNA im Glyoxalgel	30
2.10.6	Transfer von RNA auf Membranen und Hybridisierung: 'Northern Blot'	30
2.10.7	Radioaktive Markierung von DNA	31
2.10.8	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	32
2.10.9	Elution von DNA aus Agarosegelen	32
2.10.10	Klonierungen mit dem TOPO® TA Vektorsystem	32
2.10.11	Isolation von Plasmid-DNA	33
2.10.12	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	34
2.10.13	DNA-Sequenzanalyse	34
2.10.14	Computeranalyse von Sequenzdaten	35
2.11	cDNA-Bank-Analyse	35
2.11.1	Konstruktion mittels SMART™ cDNA Library Construction Kit	35

2.11.2	Reverse Transkription und 'Long Distance' (LD)-PCR	36
2.11.3	Proteinase K- und <i>Sfi</i> -Verdau	37
2.11.4	Größenfraktionierung der cDNA mittels CHROMA SPIN-400 Säulen	38
2.11.5	Ligation in den Phagenvektor λ TriplEx2	38
2.11.6	Verpackung der erstellten Bank in λ Phagen	39
2.11.7	Titerbestimmung der Primärbank	39
2.11.8	Screening der Primärbank	40
2.11.9	<i>In vivo</i> Excision	41
2.12	Aktivitätsbestimmung der Laktat-Dehydrogenase	41
2.13	Student's t Test	42
2.14	Zellbiologische Methoden	43
2.14.1	Zellkultur	43
2.14.2	Kultivierung von Säugerzellen	43
2.14.3	Kryokonservierung und Reaktivierung von Säugerzelllinien	44
2.15	Bindungsstudie: Markierung mit Te-BSA-FITC	44
2.16	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	45
2.17	Proteinanalytik	45
2.17.1	Proteinisolation	45
2.17.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	46
2.17.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels CB-X™ Protein Assays	46
2.17.4	Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure	47
2.17.5	Vorbereitung von Proteinproben für die SDS-PAGE	47
2.17.6	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen: SDS-PAGE	47
2.17.6.1	Einfache PAA-Gele	47
2.17.6.2	Gradientengele	48
2.17.7	Hochauflösende 2D Gelelektrophorese (Isoelektrische Fokussierung)	49
2.17.8	Färbung von Gelen nach Gelelektrophorese	49
2.17.8.1	Färbung mit PageBlue™ Protein Staining Solution	49
2.17.8.2	Kolloidale Färbemethode mit Coomassie Brilliantblau G-250	50
2.17.9	Massenspektrometrie von Proteinen	50
2.17.10	'Western-Blot': Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran	51
2.17.11	Overlay: Detektion mit Te-BSA-FITC	51
2.17.12	Overlay: Detektion mit Te-BSA	52
2.17.13	Metabolische Markierung von Makrophagen mit TRAN ³⁵ S-Label™ und anschließende Proteinanalyse	53
2.17.14	Vesikelisolation mit dem MACS-System	54
3.0	Ergebnisse	57
3.1	Expressionsanalysen	58
3.2	Analyse der mAR-Expression mit Te-BSA-FITC	58
3.3	Analyse der iAR-Expression mittels RT-PCR	59
3.4	Konstruktion und 'Screening' einer Lambda-Phagenbank	62
3.4.1	Konstruktion einer λ -Phagenbank	62
3.4.2	Konstruktion einer cDNA-Bibliothek mit Hilfe des SMART cDNA Library Construction Kits	63
3.4.3	Sequenzanalyse	65
3.4.4	'Screening' der Primärbank	66
3.5	Aufreinigung von Te-BSA-FITC-mAR-Komplex enthaltenden Vesikeln mittels MACS	67

3.6	Immunpräzipitation metabolisch markierter Proteine	68
3.7	Western-Blot-Analyse verschiedener Proteinfractionen	69
3.7.1	'Overlay' mit Te-BSA-FITC-Konjugat	69
3.7.2	'Overlay' mit Te-BSA-Konjugat	71
3.8	Hochauflösende 2D Gelelektrophorese: Isoelektrische Fokussierung	73
3.9	MALDI-TOF Analyse der isolierten Proteine und Abgleich mit Peptid-Datenbanken	74
3.10	Funktionelle Analyse verschiedener Steroidkonzentrationen auf die Laktatdehydrogenase-Aktivität <i>in vitro</i>	78
4.0	Diskussion	81
4.1	Expressionsanalysen, Konstruktion und 'Screening' einer Lambda-Phagenbank	81
4.2	Aufreinigung von Te-BSA-FITC-mAR-Komplex enthaltenden Vesikeln mittels MACS	84
4.3	Immunpräzipitation metabolisch markierter Proteine	85
4.4	Detektion und Analyse spezifisch-Testosteron bindender Proteine	86
4.5	Ausblick	90
5.0	Zusammenfassung	93
6.0	Literatur	95
7.0	Abkürzungsverzeichnis	107
8.0	Danksagung	109
9.0	Lebenslauf	111

1.0 Einleitung

1.1 Androgene

Die Ausdifferenzierung und Reifung der männlichen Fortpflanzungsorgane, die Entwicklung der sekundären männlichen Sexualmerkmale, sowie die Ausprägung des männlichen Verhaltens wird durch die zu den Steroidhormonen gehörenden Androgene induziert (Norman *et al.*, 1987). Androgene werden in den Testes produziert und gehören zur Gruppe der C19-Steroide, deren chemische Bezeichnung auf Androstan zurückzuführen ist (Reinboth, 1980).

Sie leiten sich vom Cholesterin (engl. Cholesterol), dem verbreitetsten Steroid ab. Man findet es in fast allen tierischen und menschlichen Geweben, insbesondere in Gehirn und Rückenmark. Seine natürliche Synthese erfolgt über Squalen, welches ausgehend von Acetyl-CoA gebildet wird. Durch enzymatische Umwandlung in Lanosterin über Squalenoxid entsteht das Cholesterin.

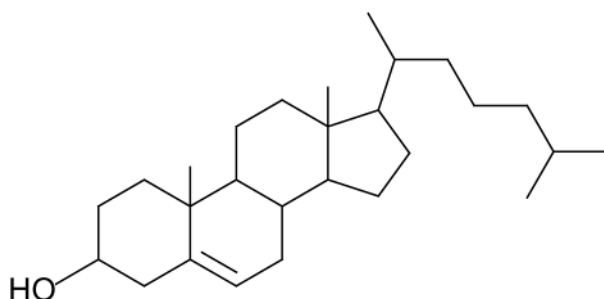


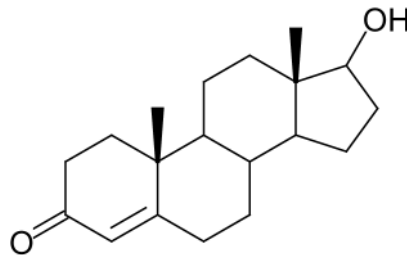
Abbildung 1.1
Cholesterin

Testosteron und 5- α -Dihydrotestosteron (DHT) gehören zu den wichtigsten Androgenen, wobei jedoch Testosteron mengenmäßig überwiegt. Das 5- α -Dihydrotestosteron entsteht durch eine Reduktion der Doppelbindung zwischen dem C4- und dem C5-Atom, hervorgerufen durch die 5- α -Reduktase (Torres *et al.*, 2003). Nur durch diese Reduktion kann das DHT in vielen Organen wie beispielsweise der Prostata und Samenblase seine Wirkung entfalten. In anderen Organen allerdings wie z.B. in Muskeln, Niere oder Lunge ist eine Bindung von Testosteron selbst an den Androgenrezeptor (AR) die Voraussetzung für eine erfolgreiche Wirkung (Kuemmerle *et al.*, 1985).

95 % des gesamten Testosterons werden in den sogenannten Leydig-

Zellen gebildet, die sich in den Testes befinden. Die restlichen 5 % des Hormones werden in der Nebenniere produziert. Bei Männern werden täglich ungefähr 6 – 7 mg gebildet. Bei Frauen findet eine tägliche Produktion von etwa 0,6 mg Testosteron im Ovar statt. Daher ist bei Männern ein konstanter Testosteronspiegel von 3 - 10 ng/ml nachweisbar, während bei Frauen ein Level von ≥ 1 ng/ml aufrechterhalten wird.

Abbildung 1.2
Testosteron



Die meisten im Blut zirkulierenden Androgene liegen in gebundener Form vor. Sie sind mit einem Trägerprotein, dem Sexualhormon-bindenden Globulin (SHBG) komplexiert (Rosner *et al.*, 1998). Allerdings können nur freie Androgene in den Zielzellen ihre Wirksamkeit entfalten. Testosteron sowie seine Derivate können in der Leber zu inaktiveren Verbindungen wie den Isomeren Androsteron, Epiandrosteron oder Ätiocholanolon umgewandelt werden. Diese werden dann über den Urin, meist als wasserlösliche Sulfate, ausgeschieden (Neumann, 1991, Kuemmerle *et al.*, 1985, von Faber *et al.*, 1980).

1.2 Klassische Steroidwirkung

Die klassische Wirkung von Steroidhormonen, ebenso wie die Wirkung einiger Vitamine und Lipidmetabolite, wird durch die Bindung an ihre spezifischen intrazellulären Rezeptoren hervorgerufen. Diese Rezeptoren werden im Allgemeinen als liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren bezeichnet (Mangelsdorf *et al.*, 1995, McKenna und O'Malley, 2002).

Zu den klassischen Steroidrezeptoren gehören Estrogen- (ER), Androgen- (AR), Progesteron (PR) und Glucocorticoidrezeptoren (GR). AR und GR sind im nicht-aktiven Zustand mit Chaperon-Komplexen im Cytolplasma assoziiert. Erst eine Ligandenbindung führt zu einer

Konformationsänderung und der Dissoziation dieser Komplexe. Dadurch folgt eine Dimerisierung des Rezeptors sowie seine Translokation in den Zellkern, wo eine Bindung an die sogenannten 'response' Elemente in der regulatorischen Region der Zielgene stattfindet.

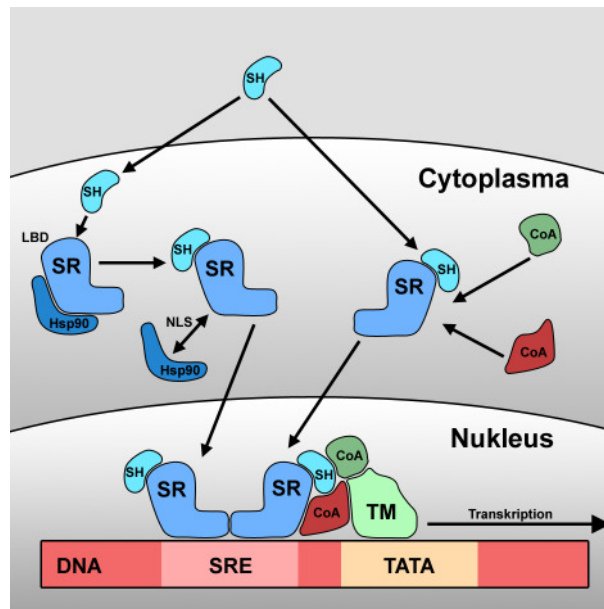


Abbildung 1.3:

Klassische Steroidwirkung. Die Bindung eines Steroidhormones (SH) an die Liganden-Bindungsdomäne des Steroidrezeptors führt zu einer Konformationsänderung. Dadurch löst sich der Rezeptor von cytoplasmatischen Chaperonen, wie dem Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), mit denen er im inaktiven Zustand assoziiert ist. Es kommt zur Interaktion mit Zell-spezifischen Co-Aktivatoren (CoA) und der Exposition des Kernlokalisationsignals (NLS). Das wiederum führt zu einer Translokation in den Zellkern, einer Homo- bzw. Heterodimerisierung des Liganden-gebundenen Rezeptors und der Bindung an sogenannte 'steroid response' Elemente (SREs, d.h. Sequenzen, die spezifisch vom Steroidrezeptor erkannt werden) auf der Promotor-Region der Zielgene. Über einen Einfluss auf die Transkriptionsmaschinerie (TM) wird so die Genexpression reguliert (Simoncini und Genazzani, 2003).

Außerdem ist für Rezeptoren von Nicht-Steroiden wie z.B. Vitamin D ein Wirkmechanismus über Assoziierung mit Co-Repressoren in Deacetylase-haltigen Komplexen im Zellkern beschrieben worden.

In Abwesenheit des Hormons kommt es zu einer Stilllegung, dem sogenannten 'silencing' der entsprechenden Promotorregionen. Die Bindung eines Liganden reduziert die Affinität für die Co-Repressoren und resultiert in einer Dissoziation des Komplexes.

Die klassische Wirkung sowohl der Steroid- als auch der Nicht-Steroidrezeptoren entfaltet sich über den Mechanismus der Transkription und Proteinsynthese (McKenna und O'Malley, 2002).

1.3 Der klassische Androgenrezeptor (AR)

Der klassische Androgenrezeptor ist ein 120 kDa großes Protein und kann sowohl Testosteron als auch 5- α -Dihydrotestosteron binden. Durch beide Hormone kann der Rezeptor aktiviert werden, wobei ihre Bindung gleichzeitig die Stabilität des Moleküls verbessert und so eine schnelle Degradierung des Komplexes verhindert wird (Kemppainen *et al.*, 1992, Zhou *et al.*, 1994).

Während der Genaktivierung bildet der Androgenrezeptor Dimere (Jones, 1990), woran unter anderem auch die DNA-Bindungsdomäne (DBD) beteiligt ist (Luisi *et al.*, 1991, Freedman, 1992). Diese Homodimere können an ein palindromisches 'Hormone Response Element' (HRE) im Promotor der Zielgene binden. HRE bestehen aus zwei Hexanukleotidsequenzen, die spiegelsymmetrisch zueinander angeordnet sind ('inverted repeats') und durch drei nichtkonservierte Basenpaare getrennt werden (Beato *et al.*, 1989, Beato und Klug, 2000). Nach Luisi *et al.* (1991) erkennt jedes der Monomere spezifisch eine der HRE-Hälften.

Der AR setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen (Wrange *et al.*, 1978, Carlstedt-Duke *et al.*, 1982, Wrange *et al.*, 1984, Carlstedt-Duke *et al.*, 1987), wobei alle Steroidrezeptoren nach dem gleichen Prinzip aufgebaut sind. Sie bestehen aus drei Hauptdomänen, einer variablen N-terminalen Region, einer kurzen, hochkonservierten, stark cysteinhaltigen zentralen Domäne und einem relativ hochkonservierten C-terminalen Abschnitt, die von weniger definierten Abschnitten getrennt werden (Beato *et al.*, 1989). Die DNA-bindende Domäne ist zentral angeordnet. In ihr liegen neun hochkonservierte Cysteinreste, die sich auch bei anderen Mitgliedern der Steroidhormonrezeptor-Familie nachweisen lassen. Acht der Cysteine der DBD sind in (Cys₂-Cys₂)-Motiven (Luisi *et al.*, 1991) angeordnet. Über die Schwefelatome der vier Cysteine eines Motivs wird ein Zinkatom tetrahedral gebunden. Jedes dieser Zinkfinger-Motive wird durch ein separates Exon des Rezeptorgens codiert. Es hat allerdings den Anschein, als hätte ein Zinkfinger alleine nicht die Fähigkeit, die DNA zu binden, vielmehr wird für diese Bindung und die folgende Transaktivierung des Promotors die kooperative Bindung aller vier Zinkfinger-Motive benötigt (Arriza *et al.*,

1987, Huckaby *et al.*, 1987, Ponglikitnongkol *et al.*, 1988, Freedman *et al.*, 1988, Green *et al.*, 1988, Hollenberg und Evans, 1988).

In der sogenannten proximalen (P-) Box des ersten Zinkfingers liegen nur wenige Aminosäuren die tatsächlich zur spezifischen Erkennung des entsprechenden 'Hormone Response Elements' (HRE) führen. Weitere Aminosäuren in der distalen (D-) Box des zweiten Zinkfingers bilden eine schwache Bindungsoberfläche für die Dimerisierung der Rezeptoren (Beato und Klug, 2000). Neben dieser DNA-Bindungsdomäne liegt eine für die Transkriptionsaktivierung verantwortliche komplexe N-terminale Region (Simental *et al.*, 1991). Die DNA- und die C-terminale hochaffine Steroid-Bindungsdomäne werden durch die Scharnier-Region, die an einer Vielzahl verschiedener Funktionen beteiligt ist, voneinander getrennt. In Abwesenheit von Hormonen unterdrückt die Steroidbindungsdomäne die Transkriptionsaktivität (Zhou *et al.*, 1994). Alle Steroidhormonrezeptoren sind in Abwesenheit ihres Liganden in großen Multiproteinkomplexen assoziiert. Diese sogenannten Chaperone sind Proteine, die zum einen die Faltung anderer Proteine unterstützen und sie zum anderen vor Anlagerung schützen. Zu ihnen gehört auch das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90). Dieses Hitzeschockprotein sorgt dafür, dass der Rezeptor solange in seinem inaktiven Zustand verweilt bis ein Hormon an ihn bindet (Beato und Klug, 2000, Pratt und Toft, 1997). Es findet eine direkte Interaktion zwischen Hsp90 und Hormonbindungsdomäne des im Cytoplasma liegenden Rezeptors statt, durch die das Kernlokalisationsignal maskiert wird. In diesem Zustand ist der Rezeptor nicht in der Lage, DNA zu binden. Bisher ist der Mechanismus dieser Rezeptorkontrolle nicht bekannt. Es ist möglich, dass die Bindung der DNA an die DNA-Bindungsdomäne sterisch verhindert wird oder aber, dass die Bindungsdomänen, je nach dem ob Hsp90 an den Rezeptor gebunden ist oder nicht, in unterschiedlichen Konformationen vorliegt. Allgemein ist für die Hormonfunktion wichtig, dass es eine aktive und eine inaktive Form des Rezeptors gibt, so dass erst durch Hormonbindung eine Transkription ausgelöst wird. Beim Übergang von der inaktiven in die aktive Form löst sich das Chaperon vom Rezeptor und gibt die DNA-Bindungsdomäne frei (Pratt und Toft, 1997). Das in der 'Hinge'-Region codierte Kernlokalisations-Signal wird ebenfalls frei zugänglich und vermittelt die Translokation des

Rezeptors in den Nukleus (Zhou *et al.*, 1994). Dieses Signal besteht aus zwei basischen Regionen, die durch 10 weitere Aminosäuren voneinander getrennt werden (Zhou *et al.*, 1994). Nach Kuemmerle *et al.* (1985) erfolgt nach einer spezifischen Ligandenbindung die Verlagerung des Rezeptors vom Cytoplasma in den Kern innerhalb einer Zeitspanne von 30 – 60 Minuten.

Der Testosteron-Androgenrezeptor-Komplex kann die Transkription in verschiedener Hinsicht beeinflussen, wobei es – abhängig vom jeweiligen Promotor - sowohl zu einer Aktivierung als auch zu einer Unterdrückung der Transkription kommen kann. Zur Regulation der Transkription muss generell ein Einfluss auf die allgemeine Transkriptionsmaschinerie ausgeübt werden. Nach Beato und Klug (2000) kommt es dabei zu Wechselwirkungen mit verschiedenen Faktoren wie 'Co-Aktivatoren', sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren sowie 'Co-Repressoren'. Diese beeinflussen die Bindung des Rezeptors an die im Kern in Form von Chromatin vorliegende DNA.

1.4 Nicht-genomische Effekte

Lange Zeit ging man davon aus, dass Steroidhormone ihre Wirkung ausschließlich über einen regulatorischen Einfluss auf den Transkriptionsprozess entfalten. Allerdings gab es bereits vor mehr als 30 Jahren die ersten Hinweise auf schnelle, sogenannte nicht-genomische Effekte: Man fand heraus, dass eine membrangebundene Form des Estrogenrezeptors (ER) in Zusammenhang mit der schnellen Aktivierung bestimmter intrazellulärer Signalwege stand (Szego und Davis, 1967, Pietras und Szego, 1975, 1977). Seit dieser Zeit gibt es immer mehr Beweise für ein breites Wirkungsspektrum dieser nicht-genomischen Effekte und ihren Einfluss auf die Regulation verschiedenster Zelltypen und Gewebe.

Nicht-genomische Effekte sind unabhängig von Transkription bzw. Proteinsynthese. Sie wirken stattdessen modulierend über cytoplasmatische oder membrangebundene regulatorische Proteine. Ubiquitäre Signalkaskaden, wie beispielsweise MAPK (mitogen-activated protein kinases), PI3 (phosphatidylinositol 3-OH kinase) oder die Tyrosin Kinase werden über diese nicht-transkriptionellen Mechanismen

beeinflusst (Migliaccio *et al.*, 1996, Watters *et al.*, 1997). Ebenso konnte eine Wirkung von nicht-genomischen Effekten auf Zellmembran-assoziierte Moleküle wie Ionenkanäle (Tesarik und Mendoza, 1995, Nakajima *et al.*, 1995, Valverde *et al.*, 1999) und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Kelly und Wagner, 1999) nachgewiesen werden. Diese Effekte treten in einem Zeitrahmen von Millisekunden bis Minuten auf und beeinflussen den Level bzw. die Aktivität von Signalmolekülen wie beispielsweise Lipiden, Ionen, Enzymen oder Proteinkomplexen. Dadurch sind sie leicht von den klassischen Steroideffekten zu unterscheiden, wobei nicht ausgeschlossen ist, dass nicht-genomische Effekte im späteren Verlauf auch transkriptionelle Effekte zur Folge haben.

Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass besonders solche Gewebe, die lange nicht als Zielort für klassische Steroideffekte galten, exzessiv über nicht-genomische Effekte reguliert werden. Dies gilt z.B. für das Kardiovaskuläre System sowie das Zentrale Nervensystem (Mendelsohn und Karas, 1999, Simoncini und Genazzani, 2000).

Die Entdeckung der von der Transkription unabhängigen Mechanismen führte zu einer Suche nach alternativen Signalwegen. Dem Phänomen dieser schnellen Effekte wurde das erste Mal 1967 große Aufmerksamkeit zuteil, als Szego und Davis veröffentlichten, dass physiologische Konzentrationen von intravenös appliziertem 17β -Estradiol in Ovar-ektomierten Mäusen innerhalb von 15 s zu einem Anstieg der Adenosin 3',5'-Monophosphat Konzentration (cAMP) im Uterus führten (Szego und Davis, 1967). Später beschrieben Pietras und Szego das Vorkommen von cytoplasmatischen Membranbindungsstellen für Estradiol (E_2) in endometrischen Zellen (Pietras und Szego, 1977), die möglicherweise für diese schnellen Steroideffekte verantwortlich waren.

Nicht-genomische Effekte können wie folgt charakterisiert werden: 1. Effekte, die innerhalb von Millisekunden bis Minuten nach Zugabe auftreten und somit zu schnell sind, um auf Transkription und Proteinsynthese zurückgeführt werden zu können, 2. Effekte, die auch in Anwesenheit von Transkriptions- bzw. Proteinsyntheseinhibitoren reproduzierbar sind, 3. Effekte, die trotz Verwendung von Zellmembran-impermeable Steroid-Konjugaten reproduziert werden können, 4.

Effekte, die in Zellen auftreten in denen keine Transkription oder Proteinsynthese stattfindet, wie bspw. in Spermatozoen und 5. Effekte, hervorgerufen durch die Bindung von Steroidhormonen an mutierte Rezeptoren, die aufgrund ihrer Mutation den Transkriptionsprozess nicht aktivieren können.

Bisher ist bekannt, dass viele dieser schnellen Steroidantworten über Signalwege laufen, die mit Membranrezeptoren assoziiert sind, wie z.B. G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), Ionenkanälen oder Enzymgekoppelten Rezeptoren (Watson, 1999). So können Steroide schnell multiple Zellfunktionen regulieren, aber trotz allem auch Einfluss auf Genexpression, Protein- bzw. DNA-Synthese oder die Zellproliferation nehmen (Castoria *et al.*, 1999). Man geht davon aus, dass eine vollständige zelluläre Steroidantwort sogar oftmals erst durch den nicht-genomischen Mechanismus komplettiert wird. Beispielsweise kommt es durch sie zu einer Aktivierung von G-Proteinen, gefolgt von einem Anstieg der Phospholipase C Aktivität (Civitelli *et al.*, 1990) und dadurch zu einem Anstieg der Signalmoleküle Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5,-Triphosphat (IP₃). Die 'Second Messenger' DAG und Ca²⁺ können gemeinsam zur Aktivierung verschiedener Isoformen der Proteinkinase C führen (Sylvia *et al.*, 1993). Diese beschriebenen Mechanismen können dann zu einer Beeinflussung der steroidinduzierten Transkription führen (Nordeen *et al.*, 1994), was zeigt, dass genomischer und nicht-genomischer Weg durchaus miteinander verknüpft sind.

Zu den durch Steroide regulierten Signalwegen gehören unter anderem die MAPK Kaskaden sowie einige Tyrosin und Lipid Kinasen.

MAP Kinasen funktionieren nach einem 'Drei-Stufen Modell', bei welchem eine hierarchische Aktivierung der Kinasen durch Phosphorylierung erfolgt (Chang und Karin, 2001). Die drei wichtigsten Kaskaden sind: ERK 1/2 (extracellular signal-related kinase), p38 und SAPK (stress-activated protein kinase) bzw. JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) (Chang und Karin, 2001, Pearson *et al.*, 2001).

Zwischen den MAP Kinasen und den Steroidrezeptoren besteht eine komplexe Beziehung, da die verschiedensten wechselseitigen Regulationsmechanismen existieren (Weigel und Zhang, 1998). So

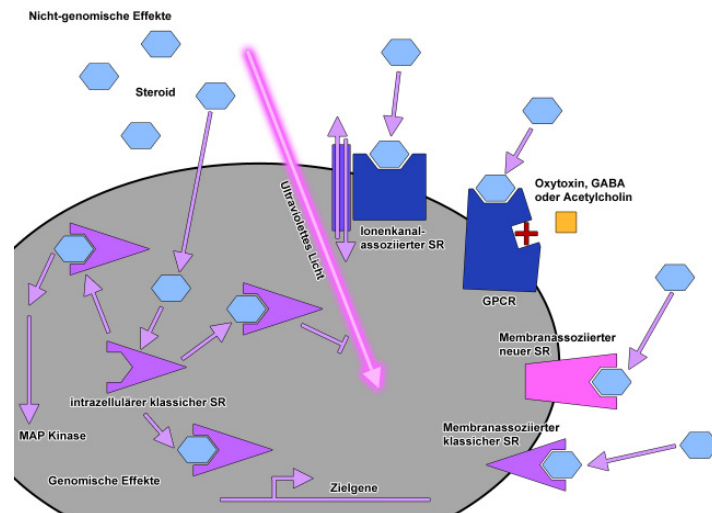
können MAP Kinasen z.B. zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung der Steroidrezeptoren führen. Obwohl der vermittelnde Mechanismus noch nicht genau bekannt ist, gibt es im Fall des Estrogenrezeptors Forschungsergebnisse, die darauf hindeuten, dass eine Phosphorylierung des Rezeptors eine wichtige Rolle bei der Liganden-unabhängigen Aktivierung spielt (Kato *et al.*, 1995). Im umgekehrten Fall führt eine Inkubation mit Estradiol zu einer schnellen Aktivierung der ERK 1/2 in den verschiedensten Zelltypen, unter anderem in Nervenzellen. Dort kann mit einem Membran-impermeablen E₂-Komplex die ERK 1/2 aktiviert werden, was eine Transkription des *c-fos* ('immediate early') Gens zur Folge hat (Watters *et al.*, 1997). Ähnliche Mechanismen können auch in Osteoblasten (Endoh *et al.*, 1997) und in weißen Adipocyten nachgewiesen werden (Garcia Dos Santos *et al.*, 2002).

Auch Testosteron hat einen regulierenden Einfluss auf MAP Kinasen. Über die Bindung an einen bisher noch nicht näher charakterisierten membrangebundenen Rezeptor induziert es beispielsweise einen schnellen Anstieg der intrazellulären freien Calciumkonzentration in Makrophagen (Guo *et al.*, 2002b). Im Gegensatz zu Estradiol ist Testosteron nicht in der Lage, eine direkte Aktivierung der ERK 1/2, p38 oder JNK/SAPK Kaskaden zu stimulieren, führt aber zu einer Abschwächung der Lipopolysaccharid (LPS) –abhängigen Aktivierung von p38 (Guo *et al.*, 2002b).

Nach wie vor bleibt allerdings die Frage, welche Art von Proteinen für die Initiierung dieser nicht-genomischen Effekt verantwortlich ist. Es gibt mehrere denkbare Möglichkeiten. So wären z.B. klassische nukleäre Steroidrezeptoren an 'nicht-nukleären' Stellen vorstellbar (Razandi *et al.*, 2002, Shaul, 2002, Kousteni *et al.*, 2001), ebenso wie G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Grazzini *et al.*, 1998, Falkenstein und Wehling, 2000), Enzyme oder Ionenkanäle, die in der Lage sind Steroidhormone zu binden. Außerdem gibt es Hinweise auf bisher uncharakterisierte membranassoziierte steroidbindende Proteine (Falkenstein *et al.*, 1999). Allerdings muss es sich dabei nicht unbedingt um einen steroidaktivierbaren Rezeptor handeln. So kann beispielsweise

Progesteron an den G-Protein gekoppelten Oxytoxin-Rezeptor binden und dessen Aktivität regulieren ohne ihn dabei selbst zu aktivieren (Grazzini *et al.*, 1998, Burger *et al.*, 1999).

Abbildung 1.4:
Mögliche Mediatoren der Steroidsignalisierung
(abgewandelt nach Picard, 2000)



Der Einfluss von Steroiden auf GPCRs ist wahrscheinlich eins der bisher am besten untersuchten Felder der nicht-genomischen Wirkungsmechanismen. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus ist die Bindung von Estrogenrezeptoren an die Phospholipase C (PLC) β in Osteoblasten durch die Interaktion mit einem G-Protein (Le Mellay *et al.*, 1997). Durch diese Bindung werden IP_3 und DAG gebildet und es kommt zu einer Ca^{2+} Mobilisierung aus Speichern des Endoplasmatischen Retikulums, was einen schnellen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge hat (Le Mellay *et al.*, 1997). Allerdings scheinen diese Effekte abhängig von der jeweiligen Isoform des G-Proteins zu sein. So ist beispielsweise in transfizierten COS-7 Zellen nachgewiesen worden, dass $ER\alpha$ die Aktivierung von $G\alpha_i$, nicht aber von $G\alpha_q$ - oder $G\alpha_s$ -Untereinheiten hervorrufen kann. Auch eine Aktivierung von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten durch $ER\alpha$ konnte gezeigt werden (Wyckoff *et al.*, 2001, Le Mellay *et al.*, 1999).

Auch bei Androgenrezeptoren konnte ein derartiger Mechanismus nachgewiesen werden. Die Makrophagen-Zelllinien IC-21 und RAW 264.7 exprimieren keinen klassischen Androgenrezeptor. Mit Hilfe eines Membran-impermeablen Te-BSA-FITC-Konjugats konnten aber eindeutig spezifische Bindungsstellen für Testosteron an der Plasmamembran detektiert werden, die als membranständiger

Androgenrezeptor (mAR) bezeichnet werden (Benten *et al.*, 1997, 1999a, 1999b, Guo *et al.*, 2002b). In diesen Zellen kann eine durch Testosteron vermittelte Calciumantwort durch den Phospholipase Inhibitor U-73122 und das auf Mitglieder der G-Protein $\alpha_{i/o}$ -Familie wirkende Pertussistoxin vollständig unterbunden werden (Benten *et al.*, 1999b, Guo *et al.*, 2002b).

Im Jahr 2003 ist es einer Arbeitsgruppe gelungen einen neuen membrangebundenen Progesteronrezeptor (mPR) sowohl zu identifizieren als auch zu charakterisieren. Das Protein wurde mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern aus der Zellmembran von Oocyten der gepunkteten Meerforelle isoliert. Sowohl seine Struktur als auch seine Funktion ähneln den bereits bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und werden durch Sequenzhomologien bestätigt. Der mPR besitzt sieben hydrophobe Transmembran-Domänen und gehört damit zur heptahelikalen Rezeptorfamilie. Mit Hilfe seiner Sequenz war es möglich, eine komplett neue Familie mPR-verwandter Proteine in den unterschiedlichsten Spezies wie Frosch, Maus und Mensch zu identifizieren (Zhu *et al.*, 2003a, 2003b).

Eine weitere Erforschung der nicht-genomischen Effekte ebenso wie die Charakterisierung weiterer membranständiger Steroidrezeptoren ist vor allem für den medizinisch/klinischen Bereich von großer Bedeutung, da es mittlerweile immer mehr Hinweise darauf gibt, dass Steroide regulierend auf jede Art von Zellen wirken können (Simoncini und Genazzani, 2003). Besonders in Bezug auf Krebs gibt es viele neue Erkenntnisse: So gibt es beispielsweise nach neuesten Forschungsberichten Hinweise darauf, dass Androgen-sensitive Prostatakrebszellen einen weniger malignen Phänotyp besitzen. Dieser zeichnet sich durch eine verminderte Migrations- und Invasionsrate aus. Durch eine Transfektion mit einem Androgenrezeptor konnte bei der Androgen-unabhängigen Zelllinie PC3 die Invasions- und Adhäsionsfähigkeit suprimiert werden. Dies wurde hervorgerufen durch eine Modulation der $\alpha_6\beta_4$ Integrin-Expression. Verantwortlich dafür ist wahrscheinlich eine über einen nicht-genomischen Weg vermittelte EGF-Antwort (Bonaccorsi *et al.*, 2000, 2004).

Aber nicht nur Androgene sondern auch andere Steroide werden auf ihre eventuellen nicht-genomischen Einflüsse auf Krebszellen untersucht. Viele der getesteten Zelllinien zeigten z.B., dass das Hormon 17 β -Estradiol nicht-genomische Signalwege aktivieren kann. Eine Bindung an den ER α -Rezeptor führt zur Proliferation und sichert so das Überleben der Zelle; eine Bindung des gleichen Hormons an den ER β -Rezeptor induziert die Apoptose (Acconcia *et al.*, 2004).

Aber nicht nur im Bereich der Krebsforschung sondern auch in Bezug auf die verschiedensten Herzerkrankungen werden die nicht-genomischen Mechanismen immer stärker diskutiert und bei der Entwicklung spezifischer Therapieansätze mit einbezogen. So kann z.B. Testosteron durch seinen gefäßerweiternden Effekt eine Behandlung von koronalen Arterienerkrankungen (CAD) unterstützen. Da diese Krankheit besonders häufig bei hypogonadalen Männern auftritt, werden als Therapeutika Testosteron-Analoga verwendet. Nachteil ist, dass durch diese Medikamentierung das Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken, ansteigt. Da diese Nebenwirkungen nur über den klassischen Androgenrezeptor vermittelt werden, bietet es sich an, Mittel zu entwickeln, die ausschließlich über den nicht-genomischen Signalweg wirken (Jones *et al.*, 2004).

Auch wichtige Zellen des Immunsystems wie Makrophagen oder T-Zellen werden über nicht-genomische Effekte beeinflusst (Benten *et al.*, 1997, 1999b, Guo *et al.*, 2002a, 2002b). Dies könnte möglicherweise besonders in Bezug auf das immer weiter verbreitete Problem von Allergien und deren Therapie eine Rolle spielen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die murine Makrophagenzelllinie RAW 264.7 keinen klassischen Androgenrezeptor (iAR) exprimiert. Trotz des fehlenden iAR ließ sich am Konfokalen Laserscanning Mikroskop (CLSM) die Bindung und Internalisierung eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Testosteron-BSA-Konjugats (Te-BSA-FITC) nachweisen. Eine Bindung des Liganden an diese als membranständige Androgenrezeptor (mAR) bezeichnete Bindungsstelle führt unter anderem zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären

Calciumkonzentration, einer Beeinflussung der Transkription der induzierbaren NO-Synthase oder des *c-fos* ('immediate early') Gens. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der mAR isoliert und charakterisiert, bzw. spezifisch Testosteron-bindende Proteine identifiziert werden, die an der Initiierung der nicht-genomischen Effekte in den RAW 264.7 Makrophagen beteiligt sind.

2.0 Material und Methoden

2.1 Enzyme und Chemikalien

6 × Agarose-Gel Ladungspuffer: MBI Fermentas GmbH., St. Leon-Roth

Agar, Hefeextrakt, Trypton: GIBCO BRL, Karlsruhe

Agarose: Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf

Ammoniumperoxodisulfat (APS): MERCK, Darmstadt

Amplify™ Fluorographic Reagent: Amersham Biosciences, Freiburg

AMV Reverse Transkriptase: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Anti-FITC Micro-Beads: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Antifluorescein-AP Conjugate: PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA

β-Estradiol: Serva Feinbiochemica, Heidelberg

β-Estradiol 6-(O-carboxymethyl)-oxime:BSA-fluorescein-isothiocyanate conjugate: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

β-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced disodium salt hydrate, BioChemika: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Biomax MR Scientific Imaging Film, Biomax MS Scientific Imaging Film: Eastman Kodak Company, New York

Biomax MR Screen, Biomax MS Screen: Eastman Kodak Company, New York

Blockierungsreagenz: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

BSA, Fraktion V: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

CB-X™ Protein Assay Kit: Geo Technology, Inc., St. Louis, Mo, USA

CDP-Star, CSPD: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

CHAPS: Biotechnik GmbH, Gaiberg

Complete Protease Inhibitor: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Diethyl-pyrocyanat (DEPC): Fluka, Neu-Ulm

DSP: Pierce Biotechnology, Rockford

DTT, High Purity: GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg

Dynabeads® Oligo (dT)₂₅: Dynal Biotech GmbH, Hamburg

ECL Hyperfilm: Amersham Biosciences, Freiburg

ECL Western Blotting Detektionssystem: Amersham Biosciences, Freiburg

Filterpapier: Whatman Ltd., Maidstone, England

Fötale Kälberserum (FCS, auf Viren, Mycoplasmen, Endotoxin getestet und sterilfiltriert): PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Gigapack® III Gold Packaging Extract: Stratagene, Heidelberg

Größenstandards λ -DNA (*EcoRI*, *HindIII* geschnitten), pUC-Mix-Marker: MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth

IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium): GIBCO BRL, Karlsruhe

L-Lactic Dehydrogenase solution from rabbit muscle Type XI: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

MiniMacs Separation Columns: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Monoclonal Antibody to Testosterone: Biodesign, Saco, ME, USA

N (Nonidet®) P40: Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Nucleobond®Ax: Macherey-Nagel, Düren

NucleoSpin®Plasmid: Macherey-Nagel, Düren

Nylon Membranes, positively charged: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

PageBlue™ Protein Staining Solution: MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

PageRuler™ Prestained Protein Ladder: MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

peqGOLD TriFast™: GIBCO BRL, Karlsruhe

Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L): Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cambridgeshire, UK

Protran® Nitrocellulose Transfer Membrane: Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Dassel

Random Hexamere Primer: MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Restriktions-Enzyme *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* sowie der zugehörige 10 × Puffer: MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Roti®Load1 4 × Konz.: Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Roti®Mark 10-150: Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Serva Blau G reinst: Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Silverstaining Kit, Protein Plus One™: Amershan Biosciences, Freiburg

SMART cDNA Library Construction Kit: BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA

Sodium Pyruvat, min. 99 %: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

T4 DNA Ligase sowie zugehöriger 10 × Puffer: MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Taq DNA Polymerase sowie zugehöriger 10 × Puffer: MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Testosteron: Paesel + Lorei GmbH & Co., Hanau

Testosterone 3-(O-carboxymethyl)oxime:BSA: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Testosterone 3-(O-carboxymethyl)oxime:BSA-fluorescein-isothiocyanate conjugate: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

TRAN³⁵S-LABEL™: MP Biomedicals, Irvine, CA, USA

Triton® X-100: Fluka Chemie AG, Buchs

Vectashield Mounting Medium: Serva, Heidelberg

weitere Chemikalien für das molekularbiologische Labor: Baker, J.T., Deventer, Niederlande; BioRad, München; Fluka, Neu-Ulm; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen

2.2 Lösungen und Puffer

Die folgende Auflistung gibt die Zusammensetzung von Puffern und Lösungen wieder, die im Text nicht näher beschrieben werden.

Äquilibrierungspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,8) 6 M Harnstoff 30 % Glycerin (99,5 % v/v) 2 % SDS Bromphenolblau (Spatelspitze)
Agarosegele	0,8 %, 1 %, 1,5 % oder 2 % Agarose in 1 × TBE Puffer aufkochen und anschließend 0,5 mg/ml Ethidiumbromid hinzufügen
Blockierungslösung für Overlay	10 % (w/v) Blockierungsreagenz (Roche) in Maleinsäurepuffer 1 % BSA
Detektionspuffer für Overlay	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl pH 9,5
E ₂ -Stammlösung	10 ⁻³ M, 0,2724 mg/ml E ₂ in Ethanol
E ₂ -BSA-FITC	1,5 × 10 ⁻³ M, 5 mg E ₂ -BSA-FITC in 1,39 ml sterilem PBS ⁻ gelöst
Einfriermedium	70 % Kulturmedium (v/v) 20 % FCS (v/v) 10 % DMSO (v/v)
Entwicklerlösung für Röntgenfilme	Kodak D-19-Entwickler 1 Dose in 15 l (37 °C) dH ₂ O lösen
Fixierlösung für Röntgenfilme	2,8 kg Thiosulfat 280 g Natrium-Kalium-Disulfid ad 14 l dH ₂ O
Fixierlösung (kolloidale Färbung)	12 % Trichloressigsäure (TCA)

Glyoxalgel-Ladungspuffer	10 mM Natriumphosphat (pH 7,0) 50 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau (aus RNase-freien Stammlösungen mischen)
Homogenisierungspuffer	20 mM HEPES (pH 7,4) 250 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT
Hypotoner Puffer	10 mM Tris HCl (pH 8,0) 1 mM MgCl ₂ pH 8,0
Kolloidale Färbelösung	80 % (v/v) Lösung C 20 % (v/v) Methanol
Lösung A	20 g 85 % Phosphorsäure 100 g Ammoniumsulfat dH ₂ O ad 980 ml
Lösung B	5 % (w/v) CBB-G-250
Lösung C	98 % (v/v) Lösung A 2 % (v/v) Lösung B
LB ^{amp} -Platten	1,5 % Agar in LB-Medium (w/v) autoklavieren 50 µg/ml Ampicilin
LB-Medium	1 % Trypton (w/v) 1 % NaCl (w/v) 0,5 % Hefe-Extrakt (w/v) ad 1 l dH ₂ O, pH 7,5 autoklavieren
LB-Platten	1,5 % Agar in LB-Medium (w/v) autoklavieren
LB-Top-Agar	0,7 % Agarose in LB-Medium (w/v) autoklavieren

'Long Ranger gel solution'	50 % Stammlösung (BMA, Rockland, ME, USA)
'Long Ranger Mastermix'	6 M Harnstoff 100 ml 5 × TBE 60 ml 'Long Ranger gel solution' ad 500 ml dH ₂ O
Lysis-Puffer	1 % Triton X-100 (w/v) 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 300 mM NaCl 5 mM EDTA (pH 8) 0,2 % Natriumazid (w/v)
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
Maleinsäurewaschpuffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl 0,3 % Tween-20 pH 7,5
Natriumphosphatpuffer (0,2 M)	107,4 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ pH 6,8 wird mit 1 M Na ₂ HPO ₄ eingestellt ad 1 l dH ₂ O
NZY-Medium (pH 7,5)	5 g NaCl 2 g MgSO ₄ × 7 H ₂ O 5 g Hefeextrakt 10 g NZ-Amin ad 1 l dH ₂ O pH 7,5
PBS ⁻	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O 0,15 g NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l dH ₂ O pH 7,2
PFA	1 % Formaldehyd in PBS ⁻

Renaturierungspuffer	4 M Harnstoff 50 mM NaCl 2 mM EDTA (pH 8) 0,2 mM DTT 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
10 × SDS-Laufpuffer	75,7 g Tris 360,3 g Glycin 250 ml 10 % SDS Stammlösung ad 1 l dH ₂ O
4 × SDS-Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,4 % SDS (w/v)
4 × SDS-Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,4 % SDS (w/v)
Sequenzgel-Lösung	40 ml 'Long Ranger Mastermix' 30 µl TEMED 250 µl APS (10 %)
SM-Phagenpuffer	5,8 g NaCl 2,0 g MgSO ₄ × 7 H ₂ O 50 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 5 ml 2 % (w/v) Gelatine ad 1 l dH ₂ O
SSC (20 ×)	175,3 g NaCl 88,2 g Natriumcitrat ad 1 l dH ₂ O pH 7
Stabilisierungslösung (kolloidale Färbung)	20 % (NH ₄) ₂ SO ₄
5 × TBE-Puffer (pH 8,0)	54 g Tris-HCl (pH 7) 3,4 g EDTA 28 g Borsäure ad 1 l dH ₂ O
Testosteron-Stammlösung	10 ⁻³ M, 0,2884 mg/ml Testosteron in Ethanol

Te-BSA-FITC-Lösung	$1,5 \times 10^{-3}$ M, 5 mg Te-BSA-FITC in 1,39 ml sterilem PBS ⁻ gelöst
Transferpuffer	190 mM Glycerin 25 mM Tris 20 % Methanol pH 8,3
Tris/BSA	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 6 mg/ml BSA
Tris/Sucrose/MgCl ₂ -Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1 mM MgCl ₂ 250 mM Saccharose

2.3 Zellkulturlinien

Verwendete immortalisierte Säugerzelllinien:
Aufgeführt werden ebenfalls ATCC- bzw. ECACC-Nummern sowie Organismus und Zelltyp

Zelllinie	Zelltyp	Organismus	Anmerkung
RAW 264.7	<i>In vivo</i> durch Abelsonschen Leukemievirus transformierte Makrophagen	Maus (BALB/c)	ATCC: TIB-71, ECACC: 91062702
RAW-fos13	Mit <i>c-fos</i> Promotor SEAP stabil transfizierte RAW 264.7 Makrophagen	Maus (BALB/c)	Guo <i>et al.</i> , 2002

2.4 Bakterienstämme

***E. coli* DH5 α** (Invitrogen, Leek, Netherlands) [Hanahan, 1983]
F⁻ ϕ 80/*lacZ*?M15 ?(*lacZYA-argF*)U169
deoR recA1 endA1 hsdR17(*r_K*, *m_K*⁺) *phoA supE44* λ *thi-1 gyrA96 relA1 tonA*

***E. coli* XL1-Blue** *endA1, gyrA96, hsdR17, lac⁻, recA1, relA1, supE44, thi-1, lac^fZ Δ M15, proAB, Tn10]*

***E. coli* BM25.8** *supE44, thi Δ (lac-proAB) [F' traD36, proAB⁺, lac^fZ Δ M15] λ imm434 (kan^R)P1 (cam^R) hsdR (*r_{K12}*⁻ *m_{K12}*⁻)*

2.5 Screening-Konjugate

Testosterone-3-(O-carboxymethyl)-oxime:BSA-fluorescein-isothiocyanate conjugate (Sigma, Deisenhofen)

β -Estradiol-6-(O-carboxymethyl)-oxime:BSA-fluorescein-isothiocyanate conjugate (Sigma, Deisenhofen)

2.6 Antikörper

Folgende Primär- und Sekundärantikörper wurden für die Screening- bzw. Westernblot-Experimente verwendet:

2.6.1 Primäre Antikörper:

Monoclonal Antibody to Testosterone: Biodesign, Saco, ME, USA

Monoclonal Antibody to Estradiol: Biodesign, Saco, ME, USA

2.6.2 Sekundäre Antikörper:

Antifluorescein-AP Conjugate NEF709: PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA

Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L): Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC, Cambridgeshire, UK

2.7 Synthetische Oligonukleotide

Amplifikation von cDNA ebenso wie Sequenzanalysen wurden mit Hilfe von Oligonukleotiden der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Die entsprechenden theoretischen Schmelztemperaturen (T_m -Werte) der Primer wurden wegen der großen Nukleotidlänge nach folgender Methode (% GC) berechnet:

$$T_m (\text{°C}) = 81,5 + 16,6 \cdot [50 \text{ mM Na}^+] + 0,41 \cdot (\% \text{ GC}) - 675/\text{Länge}$$

Primer für die Sequenzanalyse sind 5'-IRD800 modifiziert. Die T_m -Werte der verwendeten Sequenzierprimer, ebenso wie die der Primer mit einer Länge von bis zu 20 Nukleotiden, wurden nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 4 \cdot \text{GC} + 2 \cdot \text{AT} + 3,3$$

Die Auswahl geeigneter Primer erfolgte mit Hilfe des Online-Programms Primer3 (www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Bezeichnung		Sequenz	T _m	Verwendung
P8-2062	ARS1	5'-GAA TGT CAG CCT ATC TTT CTT AAC G-3'	59,7 °C	RT-PCR
M1-2405		5'-TGC CTC ATC CTC ACA CAC TGG C-3'	64,0 °C	RT-PCR
P6-2084	ARS2	5'-ACG TCC TGG AAG CCA TTG AGC C-3'	64,0 °C	RT-PCR
M1-2622		5'-GAA CCA CTC GAC CAT CTT CGC G-3'	64,0 °C	RT-PCR
P3-2146	ARS3	5'-TCC TTT GCT GCC TTG TTA TCT AGC-3'	61,0 °C	RT-PCR
M1-2405		5'-TGC CTC ATC CTC ACA CAC TGG C-3'	64,0 °C	RT-PCR
P5-1543	ARD1	5'-GAC CTT GGA TGG AGA ACT ACT CCG-3'	64,4 °C	RT-PCR
M9-2031		5'-GGT TGG TTG TTG TCA TGT CCG GC-3'	64,2 °C	RT-PCR
P2-1434	ER α 1	5'-ACA GGA ATC AAG GTA AAT GTG TGG-3'	59,3 °C	RT-PCR
M1-1807		5'-CTC CAG GAG CAG GTC ATA GAG G-3'	64,0 °C	RT-PCR
P9-1350	ER α 2	5'-GGC TGG AGA TTC TGA TGA TTG G-3'	60,3 °C	RT-PCR
M5-1935		5'-GGG TAT GTA GTA GGT TTG TAA GG-3'	58,9 °C	RT-PCR
P7-710	ER β 1	5'-CAA TGT GCT AGT GAG CCG TCC-3'	61,8 °C	RT-PCR
M4-1209		5'-CTG CTG CTG GGA AGA GAT TCC-3'	61,8 °C	RT-PCR
T7-Promotor	-	5'-ATT ATG CTG AGT GAT ATC CC-3'	53,2 °C	Sequenzreaktion

Tabelle 2.1:
Verwendete
Oligonukleotide

2.8 Versuchstiere

Als Versuchstiere (zur Organentnahme) wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse der Inzuchtstämme C57BL/10 und C57BL/6 sowie NMRI-Mäuse aus der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität verwendet. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Kunststoffkäfigen auf Kleintierstreu. Ernährt wurden die Tiere mit der Standard-Diät Nohrlin 10H10 (Nohrlin, Bad Salzuflen) und Wasser *ad libitum*.

2.9 Probenvorbereitung

2.9.1 Organentnahme

Mäuse wurden, wenn nicht anders beschrieben, durch cervikale Dislokation (Genickbruch) getötet. Anschließend wurden die Organe aseptisch entnommen. Diese wurden daraufhin entweder sofort nach der Entnahme in peqGOLD TriFast™-Reagenz im Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen) homogenisiert oder bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei - 80 °C gelagert.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Isolation von Gesamt-RNA mittels peqGOLD TriFast™

Die Isolation der RNA erfolgte mittels peqGOLD TriFast™-Reagenz. Bei dem Reagenz handelt es sich um eine einphasige Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat. Es zerstört Zellen und ihre Komponenten, bewahrt aber gleichzeitig die Integrität der RNA. Die Methode (Chomczynski, 1993) stellt eine Weiterentwicklung der RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi (1987) dar.

RNA kann schnell durch stabile exogene RNasen angegriffen und zerstört werden. Daher wurden alle verwendeten Lösungen und Gefäße vor Versuchsbeginn für mindestens 2 h mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. DEPC inaktiviert RNasen vor allem, indem es Histidinreste im aktiven Zentrum der Enzyme kovalent modifiziert. Durch

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C und einem Druck von 2 bar zerfällt überschüssiges DEPC zu Ethanol und Kohlendioxid. Zudem wurden alle Arbeiten mit Handschuhen durchgeführt.

Die Zellen wurden mit 1 ml peqGOLD TriFast™ Reagenz pro 10 cm Gewebeschale versetzt, geschabt und in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform pro ml peqGOLD TriFast™ zugegeben. Das Gemisch wurde für 15 s kräftig geschüttelt und danach 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 5.000 rpm und 4 °C in einer Heraeus-Untertischzentrifuge (Heraeus, Langenselbold). Während der Zentrifugation bildeten sich drei Phasen, eine rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine farblose, wässrige Phase, in der sich ausschließlich die RNA befand. Diese wässrige Phase wurde abgenommen und in ein frisches 12 ml Röhrchen (Greiner, Solingen) überführt. Zur Fällung der RNA wurden pro 1 ml ursprünglich eingesetztem peqGOLD TriFast™ 0,5 ml Isopropanol zugegeben. Dieses Gemisch wurde 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann 30 min bei 12.000 rpm und 4 °C im JA-20-Rotor in der Beckman JS 21 Zentrifuge (Beckmann JS 21 Zentrifuge: Fullerton, USA) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 1 ml 80%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde das Pellet luftgetrocknet und anschließend in 100 µl H₂O resuspendiert. Um die Ausbeute und Reinheit der RNA photometrisch (Beckmann Spektrophotometer DU 640) zu bestimmen (*Kapitel 2.10.4*), wurden die Proben in Dinatriumhydrogenphosphat verdünnt.

2.10.2 Isolation von Poly(A)⁺ RNA

Die Isolierung von Poly(A)⁺ RNA stellt eine Methode zur Anreicherung von mRNA dar. Zur Gewinnung der mRNA aus zuvor aufgereinigter Gesamt-RNA wurde das 'Dynabeads® mRNA Purification Kit' (DynaL Biotech, Hamburg) verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Diese Isolationsmethode nutzt das Zustandekommen von Basenpaarungen zwischen Poly(A)⁺-Schwänzen am 3'-Ende der meisten mRNAs und Oligo(dT)-Resten, die kovalent an die Oberfläche der 'Dynabeads Oligo (dT)₂₅' gebunden sind. Andere RNA-Spezies und DNA

hybridisieren nicht und können deshalb leicht durch wiederholte Waschschriffe entfernt werden. Die 'Dynabeads' wurden während des Waschens mit Hilfe eines Dynal MPC[®]-S-Magneten (Dynal, Hamburg) an der Wand des Reaktionsgefäßes fixiert.

2.10.3 Expressionsanalyse: RT-PCR

Mittels PCR ('Polymerase Chain Reaction') und entsprechenden Primerpaaren kann eine bestimmte Gensequenz amplifiziert werden. Die RT-PCR umfasst die Reverse Transkription (RT) von Gesamt-RNA und die anschließende PCR zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels sequenzspezifischer Primer.

In der Reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt, hier die sogenannte Reverse Transkriptase AMV. Als Primer für die cDNA-Synthese dienen Random Hexamer Primer, kurze Fragmente mit zufälliger Nukleotidsequenz oder Oligo-(dT)-Primer, die aus einer Nukleotidabfolge von 12 - 18 dTs bestehen, die an den poly(A)-Schwanz von eukaryontischen mRNAs binden können.

Der Reaktionsansatz für die RT setzte sich wie folgt in einem Gesamtvolumen von 25 µl zusammen: 1 µg Gesamt-RNA, 1 µl dNTPs (10 mM), 1,2 µl DTT (100 mM), 5 µl 5 × Puffer und 1 µl AMV Reverse Transkriptase (25 U/µl) sowie 1 µl Oligo-(dT)-Primer (0,5 µg/µl) bzw. 1 µl Random Hexamer Primer (50 µM) als Startmoleküle der cDNA-Synthese. Auf eine Inkubation für 10 min bei 22 °C folgte die cDNA-Synthese für jeweils 30 min bei 42 °C und 55 °C. Das Enzym wurde anschließend für 5 min bei 95 °C hitzeinaktiviert (PTC-200 Thermocycler, MJ Research BIOZYM, Hessisch Oldendorf). Für jede RT wurden zwei weitere Reaktionen ohne Reverse Transkriptase bzw. ohne RNA-Template als Negativkontrollen durchgeführt. Für die sich anschließende PCR wurde die Hälfte des Reaktionsansatzes mit 5 µl 10 × PCR-Puffer, 5 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl dNTPs (10 mM), jeweils 1 µl (10 µM) der sequenzspezifischen 5'- und 3'-Primern sowie 30,5 µl H₂O versetzt und mit Mineralöl überschichtet. Die Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl) wurde per 'Hot Start', d.h. erst nach dem initialen Denaturierungsschritt hinzu gegeben. Der initialen 1minütigen Denaturierung bei 95 °C folgten 35

Zyklen bestehend aus 1 min Denaturierung bei 95 °C, 1 min 'Annealing' bei 56 °C und 1 min Kettenverlängerung bei 72 °C. Eine terminale Elongation von 15 min bei 72 °C beendete die Reaktion.

2.10.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in DNA- oder RNA-Präparationen wurde photometrisch unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt:

$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon \times c \times d}$$

$$\rightarrow \log I_0/i = \varepsilon \times cd$$

$$\rightarrow c = \varepsilon^{-1} \times E \times d^{-1}$$

c = Konzentration der Lösung

$\log I_0/I = E$ (Extinktion) = A (Absorption)

ε = spezifischer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke der Küvette

Die photometrische Bestimmung des Extinktionskoeffizienten beruht auf dem Prinzip der Absorption des Lichts durch die in der Lösung befindlichen Moleküle. Einige Wellenlängen werden wegen entsprechender Molekülstrukturen stärker absorbiert als andere, woraus sich die sogenannten Absorptionsmaxima ergeben.

Die Bestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung der Absorption bei Wellenlängen von $\lambda=260$ nm, 280 nm und 320 nm mit einem Beckmann DU 640 Spektralphotometer. DNA und RNA absorbieren im UV-Licht bei 260 nm. Für DNA-Messungen gilt: Eine A_{260} -Einheit entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ (Sambrook *et al.*, 2001). Der 280 nm Messwert ist ein Maß für die Verunreinigung durch Fremdproteine, wohingegen der Messwert bei 320 nm die unspezifische Streuung widerspiegelt. Die Streuung muss von der Absorption bei 260 nm und 280 nm substrahiert werden. Aus dem Quotienten A_{260}/A_{280} kann die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren bestimmt werden. Für DNA sollte der Wert zwischen 1,7 und 1,9, für RNA zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

2.10.5 Auftrennung von RNA im Glyoxalgel

Die RNA-Gelelektrophorese erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach Sambrook *et al.* (1989). Dafür wurde die RNA-Probe (20 µg in 3,6 µl) zusammen mit dem zum Größenvergleich herangezogenen Standard (7,5 µg *EcoRI/HindIII* doppelt restringierte λ-DNA, Fermentas St. Leon-Roth) mit 3,6 µl 6 M Glyoxal, 10,5 µl DMSO und 3 µl 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 7,0) versetzt und 1 h bei 50 °C inkubiert. Dabei bricht DMSO die Wasserstoffbrücken auf, damit Glyoxal bei neutralem pH-Wert kovalent an die Guanidinreste binden kann und eine Basenpaarung der RNA verhindert wird. Nach der Denaturierung wurde die Probe 5 min auf Eis abgekühlt, für 5 s zentrifugiert und anschließend mit 2,7 µl Glyoxal-Ladungspuffer versetzt. Die Proben wurden in einem 1,2%igen Agarosegel in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0), der auch als Laufpuffer verwendet wurde, bei 3 - 4 V/cm für ca. 3 h aufgetrennt. Um die Ausbildung eines pH-Gradientens und die damit verbundene Dissoziation des Glyoxals von der RNA zu verhindern, wurde der Puffer nach 10minütiger Einlaufphase mit Hilfe zweier Magnetrührer konstant gemischt. Nach dem Gellauf wurde die Markerspur abgeschnitten, 20 min in 50 mM NaOH gewaschen, um das Glyoxal zu entfernen, 2 mal für 20 min in 10 mM Natriumphosphat neutralisiert und schließlich im selben Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die Spuren mit der aufgetrennten RNA wurden anschließend sofort auf eine Nylonmembran geblottet (*Kapitel 2.10.6*).

2.10.6 Transfer von RNA auf Membranen und Hybridisierung: 'Northern Blot'

Mit Hilfe einer abwärts gerichteten Kapillarblot-Technik unter Verwendung eines alkalischen Transferpuffers (Chomczynski, 1992) wurde die RNA auf eine neutrale Nylonmembran (Hybond-N, Amersham, Freiburg) geblottet. Die Membran wurde für 15 min in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer pH 6,8 neutralisiert und anschließend die RNA durch UV-Crosslinking (E=120 mJ, UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA) auf der Membran immobilisiert. Zur Prähybridisierung wurde die Membran für 2 h bei 65 °C in der 'Express-Easy-Hyb'-Lösung

(Clontech, Palo Alto) vorinkubiert. Hybridisiert wurde mit einer durch 'Random Priming' radioaktiv markierten Sonde (50 ng) über Nacht bei 65 °C. Anschließend wurde die Membran zweimal jeweils 20 Min ebenfalls bei 65 °C mit Waschlösung I sowie zweimal für je 1 h mit Waschlösung II gewaschen und danach mit einem Kodak Biomax Röntgenfilm und einer Kodak Verstärkerfolie für mehrere Stunden oder Tage bei – 80 °C in einer speziellen Kassette exponiert.

2.10.7 Radioaktive Markierung von DNA

Die als Sonde benötigte cDNA wird durch Restriktion aus dem Vektor ausgeschnitten und durch Gelelektion aufgereinigt. Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte durch 'Random Priming' in Gegenwart von [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1984). Die Reaktion wurde mit Hilfe des Megaprime™ DNA Labelling Kits (Amersham, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für ein Probenvolumen von 50 μl wurden etwa 30 ng DNA eingesetzt, die in maximal 10 μl DEPC- H_2O gelöst und nach Zugabe von 5 μl des 'Random-Nonamer-Primer'-Gemisches zunächst für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt wurden. Zu diesem Ansatz wurden bei Raumtemperatur 10 μl 'Labelling Puffer', 5 μl [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (MP-Biomedicals, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; spezifische Aktivität 3.000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$), sowie 2 μl Klenow-Enzym (1 U/ μl) pipettiert. Die einzelnen Bestandteile wurden vorsichtig gemischt, wobei das Klenow-Enzym (das große Fragment der DNA-Polymerase I von *E.coli*) die Anlagerung von Mononukleotiden aus Desoxynucleosid-5'-triphosphaten an das 3'-OH-Ende einer Primer-DNA katalysiert, die mit einer Template-DNA einen Duplex bildet. Die Reaktion wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die nicht eingebauten Nukleotide über eine 'NucleoSpin® Extract' Säule (Macherey Nagel, Düren) nach dem vom Hersteller angegebenen Verfahren abgetrennt. Vor der Hybridisierung müssen die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und 2 min auf Eis gelagert werden.

2.10.8 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch die Agarose-Gelelektrophorese in einer horizontalen Flachbettkammer nach Sambrook *et al.* (2001). Als Gel- und Kammerpuffer diente 1 × TBE. Vor der Beladung des Gels wurde die DNA mit 6 × Ladungspuffer (Fermentas, St. Leon-Roth) versetzt und dann in Gelen mit 0,8 - 2 % Agarose (Biozym, Hess, Oldendorf) und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid/ml bei einer elektrischen Feldstärke von 0,8 - 4 V/cm aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurden verschiedene Längenstandards benutzt. Für größere Fragmente wurden 2 µg *EcoRI/HindIII* doppelt restringierte λ-DNA, für kleinere Fragmente 2 µg pUC-Mix-Marker (beide Marker: Fermentas, St. Leon-Roth) eingesetzt.

2.10.9 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die gewünschten Fragmente der in Agarosegelen aufgetrennten DNA (*Kapitel 2.10.8*) wurden unter langwelligem UV-Licht mit Hilfe eines Skalpels aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mittels des 'NucleoSpin[®] Extract' Kits (Macherey Nagel, Düren) nach dem vom Hersteller angegebenen Verfahren eluiert. Die DNA wurde dann in TE-Puffer oder dH₂O aufgenommen und bei – 20 °C gelagert.

2.10.10 Klonierungen mit dem TOPO[®] TA Vektorsystem

Bei der Klonierung von PCR-Produkten in die Vektoren des TOPO[®] TA Klonierungssystems macht man sich die Eigenschaft vieler thermostabiler DNA-Polymerasen zu Nutze, ein Desoxyadenosin an das 3'-Ende aller doppelsträngigen DNA-Moleküle anzufügen. PCR-Produkte können dann aufgrund dieser Überhänge am 3'-Ende direkt in die TOPO[®] TA Vektoren kloniert werden, da diese kompatible Desoxythymidinüberhänge am 3'-Ende besitzen.

Das zu klonierende Fragment wurde zunächst mit Hilfe des 'NucleoSpin[®] Extract' Kit (Macherey Nagel, Düren) nach dem vom Hersteller angegebenen Verfahren aus dem Agarosegel aufgereinigt (*Kapitel*

2.10.9). Anschließend wurden 4 µl der so gewonnenen DNA zu 1 µl TOPO® TA Vektor und 1 µl Salz-Lösung pipettiert, vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels Hitzeschock wurde das Plasmid dann in kompetente Zellen transformiert. Dafür wurden 2 µl des Ligationsansatzes auf kompetente *E. coli* Top10 F'-Zellen gegeben und dieser Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der 30sekündige Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis wurden die Zellen mit 250 µl SOC-Medium versetzt und für 1 h horizontal bei 280 rpm und 37 °C im Schüttler inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf vorgewärmte LB^{amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der restliche Ligationsansatz wurde bei 4 °C gelagert, um eventuell für weitere Transformationen verwendet werden zu können.

2.10.11 Isolation von Plasmid-DNA

Die Methode der Plasmid-Mini-Präparation basiert auf der modifizierten alkalischen Lyse von Birnboim und Doly, 1979 (Birnboim, 1983). Die Trennung der Plasmid-DNA, sowohl von chromosomaler DNA als auch von Zellproteinen, erfolgte nach Angaben des Herstellers durch Anionenaustauschchromatographie über eine Nucleospin-Säule (Macherey-Nagel, Düren). Die Flüssigkultur mit einem Antibiotikum (10 µg/ml) zur Selektion wurde über Nacht bei 37 °C und 280 rpm bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert.

Zur Durchführung dieser Methode wurden Zellen einer 3 ml Übernachtkultur verwendet. Die Ausbeute lag bei 10 - 30 µg Plasmid-DNA pro 3 ml Kultur.

Um größere Mengen Plasmid-DNA gewinnen zu können, wurde mit dem 'NucleoBond PC100' Kit (Macherey Nagel, Düren) gearbeitet. Zur Aufreinigung wurde mit einer Übernachtkultur nach Angaben des Herstellers verfahren, die eluierte Plasmid-DNA durch Zugabe des 0,7fachen Volumens Isopropanol über Nacht bei – 20 °C gefällt und am nächsten Tag etwa 1 h bei 11.000 rpm und 4 °C (Beckman-Zentrifuge, JS-13.1 Rotor) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.10.12 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die Inkubationsbedingungen bezüglich der Puffer wurden nach den vom Hersteller empfohlenen Angaben gewählt. Die eingesetzte Enzymmenge ist abhängig von DNA-Menge und Häufigkeit der Schnittstelle in der zu schneidenden DNA. Die Restriktionsansätze wurden bei 37 °C für 2 - 3 h inkubiert. Um sogenannte Sternaktivität zu vermeiden, wurde die Konzentration der Enzymlösung auf 1/10 des Reaktionsvolumens beschränkt (Polisky *et al.*, 1975).

2.10.13 DNA-Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente wurde nach dem sogenannten Kettenabbruchverfahren durch Didesoxynukleosid-Triphosphate gearbeitet (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzreaktion wurde das 'Thermosequence Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit' mit 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet.

Für den Mastermix wurden 1,5 – 2 µg Plasmid-DNA mit 1,5 µl IRD-800-markiertem Sequenzier-Primer (Konzentration: 0,3 pmol/µl) versetzt und das Reaktionsvolumen mit dH₂O auf 13 µl aufgefüllt. In 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen wurden je 3 µl des Mastermixes vorgelegt und mit jeweils 3 µl eines Gemisches aus Di-Desoxy-Nucleotid-Triphosphaten (entweder A, C, G oder T), Desoxynucleotiden, Enzym und Puffer vermischt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Ansätze mit 10 µl Mineralöl (Sigma, Deisenhofen) überschichtet. Die eigentliche Sequenzreaktion erfolgte in einem Thermocycler (MJ Research, Biozym, Hessisch Oldendorf). Bei diesem sogenannten 'Cycle Sequencing' wurde die zu analysierende DNA-Probe für 2 min bei 94 °C denaturiert. Angeschlossen daran erfolgten 33 Zyklen aus 1 min Primer-Bindung und Verlängerung bei 55 °C und erneuter Denaturierung für 30 s bei 94 °C. Durch die Zugabe von 6 µl Formamid-Ladungspuffer (Bestandteil des Sequenzier-Kits) wurde die Reaktion gestoppt.

1,3 – 2 µl der Reaktion wurden nach dreiminütiger Denaturierung bei 72 °C und anschließender Abkühlung auf Eis auf das vorgeheizte Sequenz-Gel aufgetragen. Die Auftrennung der IR-markierten DNA-Fragmente

erfolgte bei 50 °C in einer 40 cm langen und 0,2 mm dicken Gelmatrix (Long Ranger Gel Solution, Calmetrix) bei 31,5 W mit einem DNA-Sequenzierer (LI-COR 4000, MWG, Ebersberg) in 1 × TBE-Puffer. Die anschließende Auswertung des detektierten IR-Signals erfolgte mit Hilfe des Programmes Base ImageIR Version 4.0 (LI-COR, MWG, Ebersberg).

2.10.14 Computeranalyse von Sequenzdaten

Nukleinsäure- und Proteinsequenzen wurden mittels der Programme BLAST und FASTA mit den Datenbanken GenBank™, Mascot und SwissProt verglichen (Smith und Waterman, 1981, Pearson und Lipman, 1988, Altschul *et al.*, 1990). Bekannte DNA- oder Protein-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms 'BLAST two sequences' (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tatusova und Madden, 1999) gegeneinander abgeglichen.

2.11 cDNA-Bank-Analyse

2.11.1 Konstruktion mittels SMART™ cDNA Library Construction Kit

Durch die Fülle der genetischen Information eines Organismus wird die Analyse eines bestimmten Gens aufgrund seines verhältnismäßig geringen Anteils erschwert. Deshalb bietet es sich an, DNA-Bibliotheken herzustellen. Dabei unterscheidet man zwei Typen von DNA-Bibliotheken. Genomische-DNA-Bibliotheken: Diese gehen von genomischen DNA-Sequenzen aus. Für die Herstellung von cDNA-Bibliotheken macht man sich exprimierte DNA-Sequenzen, d.h. mRNA zu Nutze.

Um große Mengen doppelsträngiger cDNA synthetisieren zu können, wird beim SMART™ cDNA Library Construction Kit für die Erststrangsynthese mit sogenannten SMART IV™ Oligonukleotiden ('Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript') gearbeitet. In herkömmlichen Verfahren wird zunächst eine Reverse Transkriptase eingesetzt, um das mRNA-Template in einzelsträngige DNA umzuschreiben. Problematisch ist dabei, dass die Reaktion oftmals

abbricht und so unvollständige Sequenzen entstehen. Dies geschieht vor allem bei langen mRNAs, insbesondere, wenn oligo(dT) Primer eingesetzt werden oder die mRNA zahlreiche Sekundärstrukturen aufweist. Ein weiteres Problem bei herkömmlichen Verfahren ist die Herstellung von 'blunt-end' cDNA mittels T4 DNA Polymerase während der Zweitstrangsynthese. Dies führt dazu, dass die 5'-Enden der resultierenden cDNA 5 - 30 Nukleotide kürzer sind als die der UrsprungsmRNA.

Das SMART™ cDNA Library Construction Kit bietet eine effektive Methode, vollständige cDNAs mit intakten 5'-Enden zu erzeugen. Dabei startet ein modifizierter Oligo(dT) Primer die Erststrangsynthese. Erreicht die Transkription das 5'-Ende, werden durch das Enzym einige zusätzliche Nukleotide, vor allem Deoxycytidine, an das 3'-Ende der cDNA angehängen. Das SMART IV™ Oligonukleotid, das eine Oligo(G)-Sequenz am 3'-Ende besitzt, kann mittels komplementärer Basenpaarung an diesen Deoxycytidinschwanz binden. Die Reverse Transkriptase führt nun den sogenannten 'Template Switch' durch, bei dem nicht mehr die eigentliche mRNA, sondern das daran angehängte SMART IV™ Oligonukleotid abgelesen wird. Die resultierende einzelsträngige cDNA enthält dadurch das komplette 5'-Ende der mRNA und die dahinter hängende, zum SMART IV™ Oligonukleotid komplementäre, Sequenz, die später als Startpunkt für die 'Long Distance'-PCR dient. Nur Einzelstrang-DNA-Moleküle, die diesen SMART-Anker besitzen, können später amplifiziert werden, was zu einer hohen Ausbeute an sogenannten 'full-length' Klonen führt.

2.11.2 Reverse Transkription und 'Long Distance' (LD)-PCR

Für die Reverse Transkription wurde ein 5 µl Ansatz vorbereitet. Dabei wurden zunächst 1 µg Poly(A)⁺-RNA (*Kapitel 2.10.2*), 1 µl SMART IV™ Oligonukleotide und 1 µl CDS III/3' PCR Primer eingesetzt. Dieses Reaktionsgemisch wurde für 2 min bei 72 °C inkubiert und dann weitere 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 2 µl 5 × First-Strand Buffer, 1 µl DTT (20 mM), 1 µl dNTP Mix (20 mM) und 1 µl PowerScript Reverse Transcriptase zugegeben. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation bei 42 °C. Zum Abbruch der Erststrangsynthese wurde das

Reaktionsgefäß auf Eis gestellt.

Für die nachfolgende LD-PCR wurden folgende Substanzen eingesetzt: 2 µl First-Strand cDNA, 80 µl dH₂O, 10 µl 10 × Advantage 2 PCR Buffer, 2 µl 50 × dNTP Mix, 2 µl 5' PCR Primer, 2 µl CDS III/3' PCR Primer, 2 µl 50 × Advantage 2 Polymerase Mix. Diese Reaktion wurde mit Mineralöl überschichtet und schließlich in die auf 95 °C vorgeheizte PCR-Maschine gestellt. Es folgte zunächst ein einminütiger Denaturierungsschritt bei 95 °C und 20 Zyklen, bestehend aus 15 s bei 95 °C und 6 min bei 68 °C. Zur Qualitätskontrolle wurde im Anschluss ein 5 µl Aliquot der Reaktion auf ein 1,1%iges Agarosegel aufgetragen.

2.11.3 Proteinase K- und *Sfi*-Verdau

Um noch in der Probe vorhandene DNA Polymerase zu deaktivieren, wurde das Produkt der LD-PCR mit Proteinase K behandelt. Dazu wurden 50 µl der doppelsträngigen cDNA mit 2 µl Proteinase K versetzt und 20 min bei 45 °C inkubiert. Anschließend wurde die cDNA extrahiert, indem zunächst 50 µl dH₂O und schließlich 100 µl Phenol:Chloroform zugegeben wurden. Die Probe wurde 1 - 2 min vorsichtig invertiert. Für eine Phasentrennung wurde 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nachdem die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde, erfolgte ein weiterer Extraktionsschritt mit Chloroform. Zur Fällung der DNA wurden 10 µl 3 M Natriumacetat, 1,3 µl Glycogen und 260 µl des im Kit enthaltenen 95%igen Ethanol zugegeben und dieser Ansatz für 20 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 100 µl 80 % Ethanol gewaschen, 10 min luftgetrocknet und anschließend in 79 µl dH₂O aufgenommen.

Um eine Ligation der cDNA in den Vektor zu ermöglichen, wurden die Enden *Sfi*I verdaut. Dazu wurden 79 µl cDNA mit 10 µl 10 × *Sfi*I Puffer, 10 µl *Sfi*I Enzym und 1 µl 100 × BSA versetzt und für 2 Stunden bei 50 °C inkubiert. Abschließend wurden 2 µl 1 % Xylene Cyanol Farbstoff zugegeben.

2.11.4 Größenfraktionierung der cDNA mittels CHROMA SPIN-400 Säulen

Mit Hilfe von CHROMA SPIN-400 Säulen wurde die amplifizierte cDNA nach dem Proteinase K- und *Sfi*-Verdau weiter aufgearbeitet. Dafür wurde die Lösung mit cDNA und Xylene-Cyanol auf die Säulenmatrix gegeben und diese dann mit 'Storage Buffer' nach Herstellerangaben durchgespült. Die aus der Säule austretenden Tropfen wurden einzeln in Reaktionsgefäßen aufgefangen und anschließend 3 µl jeder Fraktion auf ein 1,1%iges EtBr-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 10 min bei 150 V. Die ersten drei detektierbaren cDNA-Fractionen wurden vereinigt und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, 1,3 µl Glycogen und 2,5 Volumen 95 % Ethanol (im Kit enthalten) gefällt. Das Gemisch wurde zunächst für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 14.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet getrocknet und in 7 µl dH₂O resuspendiert.

2.11.5 Ligation in den Phagenvektor λ TriplEX2

Da das optimale Verhältnis von cDNA zu Vektor in der Ligrationsreaktion ein kritischer Faktor ist, muss es empirisch für jede Vektor/cDNA-Kombination getestet werden. Daher wurde in drei parallelen Ligationen dieses Verhältnis variiert (*Tabelle 2.2*). Als Effektivitätskontrolle wurde zeitgleich eine Test-Ligation mit dem im Kit enthaltenen Kontroll-Insert angesetzt. Die Ligrationsansätze wurden mindestens über Nacht bei 16 °C im Wasserbad inkubiert.

Tabelle 2.2:
Zusammensetzung der
verschiedenen Ligrationsansätze

	1. Ligation (µl)	2. Ligation (µl)	3. Ligation (µl)
cDNA	0,5	1	1,5
Vektor (500 ng/µl)	1	1	1
10 × Ligation Buffer	0,5	0,5	0,5
ATP (10 mM)	0,5	0,5	0,5
T4 DNA Ligase (30 U/µl)	0,5	0,5	0,5
dH₂O	2	1,5	1
Gesamtvolumen (µl)	5	5	5

2.11.6 Verpackung der erstellten Bank in λ Phagen

Für die Verpackung der in den Vektor klonierten cDNA in λ Phagenköpfe wurden 'Gigapack[®] III Gold Packaging' Extrakte (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Pro Ligation wurde ein Verpackungsansatz kurz angetaut, dann wurden 2 μ l des Ligationsansatzes hinzu pipettiert und luftblasenfrei gemischt. Nach 90 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 500 μ l SM Puffer sowie 20 μ l Chloroform zugegeben. Die Qualität der cDNA und die Effektivität der Verpackung konnten nun über den Titer ermittelt werden.

2.11.7 Titerbestimmung der Primärbank

Die Größe der Primärbank wurde mit Hilfe des Titers (pfu/ μ l) bestimmt. Man spricht von einer für die mRNA Komplexität repräsentativen Bank, wenn diese mindestens 1×10^6 unabhängige Klone umfasst. Es wurde zunächst eine XL1-Blue Vorkultur angeimpft. Dem Medium wurde 10 mM $MgSO_4$ und 0,2 % Maltose zugesetzt, um die Phagenadsorption zu optimieren. Diese Kultur wurde üN bei 37 °C und 280 rpm inkubiert, bis eine OD_{600} von 2,0 erreicht war. Anschließend wurden die Zellen bei 5.000 rpm für 5 min abzentrifugiert, das Pellet in 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert und auf eine OD_{600} von etwa 0,5 eingestellt. Von jedem zu titernden Ansatz wurden je eine 1:5 und eine 1:20 Verdünnung in SM-Puffer angesetzt. Zu 200 μ l der XL1-Blue üN-Kultur wurde dann jeweils 1 μ l der verdünnten Phagen gegeben und für 10 - 15 min bei 37 °C inkubiert, um eine Phagenadsorption zu erreichen. Anschließend wurden pro Probe je 2 ml 45 °C warmer Top-Agar zugegeben, das Gemisch kurz per Vortex gemischt und auf trockenen, vorgewärmten (37 °C) Agarplatten luftblasenfrei ausplattiert. Nachdem sichergestellt wurde, dass der Top-Agar ausgehärtet war, wurden die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die entstandenen Plaques wurden am nächsten Tag gezählt und der Titer nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{Anzahl Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^3 \mu\text{l/ml}}{\text{ausplattierte } \mu\text{l der Phagenverdünnung}}$$

2.11.8 Screening der Primärbank

Um die Primärbank zu screenen, sollten pro 100 mm Platte ca. 2×10^4 Plaques ausplattiert werden. Dafür wurden jeweils 400 μl XL1-Blue Zellen ($\text{OD}_{600} = 0,5$) mit der entsprechenden Menge Phagensuspension versetzt, zur Adsorption für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend ausplattiert. Die Platten wurden dann bei 37 °C über Nacht inkubiert, bis sich im Bakterienrasen deutliche Lysehöfe zeigten.

Um zu verhindern, dass sich beim Phagenabklatsch der Top-Agar ablöste, wurden die Platten vor Beginn des Screenings zunächst auf 4 °C abgekühlt und anschließend mindestens 30 min lang getrocknet. Auf den mit Lysehöfen durchsetzten Bakterienrasen wurden nun zugeschnittene Nylonmembranen (Nylon Membranes, positively charged, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) platziert, die mit Hilfe einer Chinatusche gefüllten Kanüle asymmetrisch angestochen und nach knapp einer Minute wieder vorsichtig abgezogen wurden. Nach dem Abziehen wurden die Filter erst 2×10 min mit Maleinsäure-Waschpuffer gewaschen und danach 30 min in Blockierlösung schüttelnd inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift, bevor die Membranen unter Schütteln 2 h mit in Maleinsäurepuffer verdünntem Testosteron-BSA-FITC (3 $\text{pg}/\mu\text{l}$) inkubiert wurden. Das ungebundene Testosteron-BSA-FITC wurde durch zwei 10minütige Inkubationen in Maleinsäure-Waschpuffer entfernt und die Membranen anschließend 1 h lang in mit Maleinsäurepuffer verdünnten Antifluorescein-AP-Antikörper (1:1000) geschüttelt. Es wurde erneut 2×10 min mit Maleinsäure-Waschpuffer gewaschen, die Filter dann 5 min lang in Detektionspuffer äquilibriert und auf eine Folie gelegt. Jede Membran wurde mit 750 μl (1:100) in Detektionspuffer verdünnter CSPD-Lösung (Roche, Mannheim) überschichtet und die Reaktion mit einer weiteren Folie vorsichtig abgedeckt, um die CSPD-Lösung gleichmäßig zu verteilen. Entstandene Luftblasen wurden durch kräftiges Drüberstreichen entfernt. Abschließend erfolgte die Exposition auf einem Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film (Roche, Mannheim) über Nacht.

Die abgeklatschten Platten wurden bis zur Detektion möglicher positiver Klone im Kaltraum bei 4 °C gelagert.

2.11.9 *In vivo* Excision

Einige Klone wurden durch *Cre/loxP* vermittelte *in vivo* Excision in den Plasmidvektor pTriplEx2 überführt, was die Sequenzierung der Inserts ermöglichte. Das Enzym *Cre* (causes recombination) katalysiert die ortsspezifische Rekombination zwischen DNA-Zielsequenzen, den *loxP*-Elementen (locus of crossing over). Das von den beiden *loxP*-Elementen flankierte Plasmid wird durch die Infektion von BM25.8 Zellen mit dem rekombinanten Phagen automatisch freigesetzt, da der Bakterienstamm eine aktive *Cre* Rekombinase exprimiert.

10 ml LB-Medium/10 mM MgCl₂ wurden mit einer Einzelkolonie von BM25.8 inokuliert und bei 31 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 1,1-1,4 erreicht hatte.

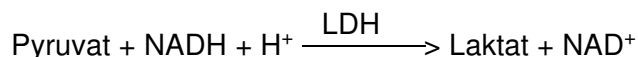
Gleichzeitig wurde ein Einzelplaque ausgestochen und in 350 µl SM-Puffer überführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, damit die Phagen aus der Agarmatrix in den Puffer diffundieren konnten. In einem 15 ml-Greinerröhrchen wurden am nächsten Tag 200 µl der BM25.8 Kultur mit 150 µl der Phagenlösung vereinigt und für 30 min bei 31 °C inkubiert, um eine Adhäsion der Phagen an die Wirtszellen zu ermöglichen. Im Anschluss wurden 200 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen für eine weitere Stunde bei 31 °C unter Schütteln (225 rpm) inkubiert. 1 - 10 µl der infizierten Zellen wurden dann auf einer LB^{amp}-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 31 °C inkubiert.

Die Plasmid-DNA mehrerer Einzelkolonien wurde schließlich isoliert (*Kapitel 2.10.11*) und sequenziert (*Kapitel 2.10.13*).

2.12 Aktivitätsbestimmung der Laktat-Dehydrogenase

Es sollte getestet werden, ob Testosteron einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) hat. Dafür wurden verschiedene Testosteron-Konzentrationen eingesetzt. Um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wurde ebenfalls die Wirkung von Ethanol bzw. Estradiol in Bezug auf die LDH-Aktivität bestimmt. Es sollte sichergestellt werden, dass ein Einfluss weder ausschließlich auf das Lösungsmittel noch auf das Steroidgerüst zurück zu führen war.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach folgendem Reaktionsschema:



Die zu messenden Proben wurden entsprechend der unten stehenden *Tabelle 2.3* angesetzt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 339 nm, wobei zunächst ein Vorlauf von 2 min, anschließend die Kinetik nach Reaktionsstart mit Pyruvat für weitere 5 min aufgenommen wurde. Die Aktivität berechnete sich gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes.

$$\text{Aktivität [U]} = \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{dE}{dt}$$

V: Küvettenvolumen (μl)

v: Probenvolumen (μl)

d: Schichtdicke (1 cm)

ε: 6,31 l · mmol⁻¹ · cm⁻¹ millimolarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 339 nm

Tabelle 2.3:
Pipettierschema für die
photometrische LDH-
Aktivitätsbestimmung

	Blank	Probe
100 mmol × l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,2	500 μl	500 μl
10 mmol × l⁻¹ NADH	20 μl	20 μl
H₂O + 0,04 U LDH	380 μl H ₂ O ohne Enzym	370 μl H ₂ O mit Enzym
20 mmol × l⁻¹ Pyruvat	100 μl	- Vorlauf registrieren -
20 mmol × l⁻¹ Pyruvat	-	100 μl
Testosteron bzw. E₂ oder EtOH	-	10 μl

Für Testosteron wurden Konzentrationen von 10⁻⁸ – 10⁻⁶ M, für Estradiol Konzentrationen von 10⁻⁹ – 10⁻⁶ M getestet.

2.13 Student's t Test

Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Student's t Test ermittelt.

2.14 Zellbiologische Methoden

2.14.1 Zellkultur

Alle in der Zellkultur verwendeten Geräte wurden entweder für 20 min bei 120 °C autoklaviert oder direkt unter der Sterilbank ihrer Verpackung entnommen. Um das Risiko von Kontaminationen zu verringern, wurden einzusetzende Medien und Lösungen ausschließlich für die Zellkultur verwendet. Erst vor Gebrauch wurde den zu verwendenden Medien steriles FCS zugesetzt.

2.14.2 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung der immortalisierten Zellen erfolgte in 110 mm Gewebekulturschalen (Greiner, Solingen) in einem Volumen von 10 ml Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Hotpack 740).

Alle 2 – 3 Tage wurden Konfluenz sowie generelle Morphologie der Zellen mit Hilfe eines Inversmikroskops (Zeiss, Oberkochen) überprüft und diese bei einer Konfluenz von 70 - 90 % subkultiviert. Dazu wurden die Kulturschalen ca. 30 min auf 4 °C abgekühlt, damit sich die adhärennten Zellen abrundeten und leichter vom Boden entfernen ließen. Mittels eines sterilen Zellschabers wurden die Zellen gelöst, gründlich resuspendiert um Zellkonglomerate bei der Subkultivierung zu vermeiden und anschließend nach Bedarf im Verhältnis von 1:2 bis 1:5 auf frische Gewebekulturschalen mit vorgewärmten Medium überführt.

2.14.3 Kryokonservierung und Reaktivierung von Säugerzelllinien

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen bei - 196 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden isoliert und bei 1.200 rpm für 10 min in einer Beckman GPKR Zentrifuge (Beckman, München) pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in Einfriermedium, bestehend aus 70 % Medium, 20 % FCS und 10 % DMSO resuspendiert, auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Kryoröhrchen mit Schraubverschluss (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Die Kryogefäße wurden in einem auf 4 °C vorgekühlten Stratacooler CRYO (Stratagene, Heidelberg) über Nacht bei - 80 °C langsam eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Reaktivierung wurden die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen sofort nach Entnahme im 37 °C-Wasserbad aufgetaut und anschließend in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Nachdem die Zellen bei 1.200 rpm und 4 °C pelletiert wurden, konnte das Pellet in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen resuspendiert werden. Die so vom Einfriermedium befreiten Zellen konnten dann auf eine 110 mm Gewebekulturschale plattiert und im Brutschrank inkubiert werden. Nach 24 h wurden die Zellen mit einem Inversmikroskop überprüft und entweder subkultiviert oder mit frischem Medium versetzt.

2.15 Bindungsstudie: Markierung mit Te-BSA-FITC

Um sicher zu stellen, dass die zur Rezeptoranalyse verwendeten Zellen den mAR exprimierten, wurde eine Bindungsstudie durchgeführt, bei der die Makrophagen mit einem an den spezifischen Liganden gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff inkubiert und schließlich unter dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop analysiert wurden.

Am Vortag wurden Deckgläschen mit Poly-L-Lysin beschichtet, um die Adhäsion der Makrophagen zu optimieren. Auf jedem Deckglas wurden dann 2×10^5 Zellen ausgesät, über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Morgen $2 \times$ mit PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurde jedes

Deckglas mit 200 µl Testosteron-BSA-FITC-Lösung überschichtet. Überschüssige Flüssigkeit wurde nach Inkubation (1, 5 oder 15 min in einer Feuchtkammer) durch zweimaliges Waschen mit PBS⁻ entfernt. Die Zellen wurden dann für 30 min mit 2 ml PFA fixiert. 5 µl Vectashield wurden auf einen Objektträger gegeben und die Deckgläschen mit der beschichteten Seite nach unten auf diesen Tropfen überführt. Zum Abschluss wurden die Deckgläser mit Nagellack abgedichtet.

2.16 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Zur Analyse der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zellen wurde ein Leica CLSM ('Confocal Laserscanning Microscope') TCS NT, Version 1.5.451 (Leica Lasertechnik, Heidelberg), verwendet, wobei die Fluoreszenz durch einen Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wurde.

Aufgenommen wurden optische Schnitte durch die Zellen (in 0,5 µm-Intervallen), wobei eine Auflösung von 1024 × 1024 Pixel gewählt wurde (Benten *et al.*, 1998, 1999). Die Analyse der Bilder erfolgte anschließend mit Hilfe der 'AVS Software' (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, MA, USA) Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

2.17 Proteinanalytik

2.17.1 Proteinisolation

Adhärente Zellen wurden zunächst mit einem sterilen Zellschaber von der Platte gelöst, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Solingen) überführt und anschließend für 10 min bei 1.200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet zweimal mit PBS⁻ gewaschen und anschließend in 5 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Mittels Glas-Teflon-Potter wurden die Zellen entweder für 30 min homogenisiert oder für eine Minute homogenisiert und dann 6 × 15 s mit Ultraschall behandelt. Das resultierende Homogenat wurde für 1 h bei 100.000 × g im Type 70 Ti Rotor in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert, der entstandene Überstand abgenommen und aliquotiert. Dieser Überstand enthielt die

lösliche Proteinfraction.

Das entstandene Pellet wurde daraufhin erneut in 5 ml Homogenisierungspuffer gelöst, größere Zelltrümmer bei $1.000 \times g$ in der Untertischzentrifuge für 10 min abpelletiert, der Überstand abgenommen und für weitere 30 min bei $20.000 \times g$ zentrifugiert. Das bei diesem Schritt entstandene Pellet wurde dann in 500 μ l Homogenisierungspuffer mit 1 % Detergenz (entweder CHAPS, NP-40 oder Triton X-100 versetzt) aufgenommen, 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert und abschließend für 1 h bei $50.000 \times g$ in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand enthielt die membrangebundenen Proteine.

2.17.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BioRad-Protein-Assays (BioRad, München) nach Bradford (1976). Für die Messung wurden je 5 μ l Probe, 795 μ l dH₂O und 200 μ l Bradfordreagenz in einer Einwegküvette gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm in einem Beckman DU 64 Spektralphotometer die Extinktion gemessen und durch den Vergleich mit einer BSA-Eichgeraden die Proteinkonzentration ermittelt.

2.17.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels CB-X™ Protein Assays

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine, die für die 2D-Analyse aufgereinigt wurden, erfolgte mit Hilfe des CB-X™ Protein Assays (Geno Technology, Inc., St. Louis, Mo, USA). Diese Methode bietet den Vorteil, dass sie mit Detergenzien kompatibel ist.

Für die Proteinbestimmung wurden 5 μ l der zu testenden Probe in ein frisches 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, 1 ml auf -20 °C vorgekühltes CB-X Reagenz zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 15.000 rpm zentrifugiert und anschließend, ohne das Pellet zu zerstören, der gesamte Überstand abgenommen. Die Proteine wurden in 50 μ l 'Solubilization Buffer I' und 50 μ l 'Solubilization Buffer II' aufgenommen, vollständig resuspendiert, anschließend mit 1 ml 'CB-X

Assay Dye' versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde gegen dH₂O bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die entsprechende Proteinkonzentration konnte dann der vom Hersteller beigelegten Tabelle entnommen werden.

2.17.4 Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA)

Proteine für die Isoelektrische Fokussierung wurden folgendermaßen gefällt: 600 µg Protein wurden mit einer 20%igen TCA-Stammlösung auf eine TCA-Endkonzentration von 6 % eingestellt und dann für 60 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt bei 15.000 rpm, für 45 min, bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl dH₂O resuspendiert. Die Fällung erfolgte mit Hilfe von 4 Volumen Aceton und einer Inkubation bei – 20 °C für mindestens 2 h. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 15.000 rpm für 30 min, bei 4 °C konnte das Pellet getrocknet werden.

2.17.5 Vorbereitung von Proteinproben für die SDS-PAGE

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration in der zu analysierenden Probe wurde die gewünschte Menge Protein (je nach Ansatz zwischen 30 - 100 µg) mit der entsprechenden Menge 4 × Roti[®]Load (Roth, Karlsruhe) versetzt und für 5 min im Wasserbad denaturiert. Ein Abkühlen auf Eis im Anschluss verhinderte eine Renaturierung der Proteine. Die Proben konnten nun entweder direkt auf das Gel aufgetragen oder zur weiteren Verwendung bei - 20 °C eingefroren werden.

2.17.6 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen: SDS-PAGE

2.17.6.1 Einfache PAA-Gele

Die Auftrennung von Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach der Methode von Lämmli (1970).

Mit Hilfe der Initiatoren TEMED und APS wurde die radikalische Polymerisation von Acrylamid und N, N'-Methylen-Bisacrylamid ausgelöst. Die Prozentigkeit der verwendeten PAA-Gele wurde je nach Größe der aufzutrennenden Proteine variiert (*Tabelle 2.4*). Als Größenstandard wurden Roti[®]Mark 10 – 150 (Roth, Karlsruhe) oder PageRuler[™] Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 1 - 3 h in einer vertikalen Flachgelapparatur in 1 × Laufpuffer. Zum besseren Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde zunächst eine Spannung von 8 V/cm angelegt und diese anschließend auf 15 V/cm erhöht. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für weitere Versuche verwendet (*Kapitel 2.17.10*).

Tabelle 2.4:
Pipettierschema für
PAA-Mini-Gele

Trenngel	15 %	12,5 %	10 %	7,5 %	Sammelgel	5 %
Acrylamid-Stock	5,0 ml	4,2 ml	3,3 ml	2,5 ml	Acrylamid-Stock	750 µl
dH ₂ O	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	dH ₂ O	3,0 ml
4 × Trenngelpuffer	2,5 ml	3,3 ml	4,2 ml	5,0 ml	4 × Sammelgelpuffer	1250 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	TEMED	10 µl
APS (10 %)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	APS (10 %)	20 µl

2.17.6.2 Gradientengele

Gradientengele sorgen bei der Proteinanalytik in SDS-Gelen für eine bessere Auftrennung, indem sie einen breiteren Trennbereich und deutlich schärfere Banden verursachen. Diese Gradientengele wurden mit Hilfe einer Gradientenmischapparatur hergestellt. Dafür wurde der Gradientenmischer auf einen Magnetrührer oberhalb des Gießstandes plaziert, so dass die Acrylamidlösung ohne Probleme in die darunterliegende Gelapparatur fließen konnte. Die verschiedenen Gellösungen wurden vorab vorbereitet (*Tabelle 2.5 bzw. 2.6*). Zunächst wurde das hintere Reservoir mit der verdünnten leichten Lösung befüllt, dann der Kanal zwischen beiden Kammern durch das Öffnen des Verbindungshahns geflutet und anschließend die konzentrierte, schwere, mit einer Spatelspitze Brilliantblau gefärbte Lösung in die vordere Kammer gegeben. Diese schwere Lösung wurde mit Hilfe eines Rührfisches konstant gemischt. Bevor Verbindungskanal und Auslass endgültig geöffnet wurden, wurden beide Lösungen mit APS versetzt.

Stammlösungen	5%	6%	7%	8%	9%	10%
Acrylamid-Stock	2,5 ml	3 ml	3,5 ml	4 ml	4,5 ml	5 ml
dH ₂ O	8,7 ml	8,2 ml	7,7 ml	7,2 ml	6,7 ml	6,2 ml
4 × Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
APS (10 %)	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl

Tabelle 2.5:
Zusammensetzung der leichten
Acrylamidlösungen für
Gradientengele

Stammlösungen	10%	12 %	14 %	16 %	18 %	20 %
Acrylamid-Stock	5 ml	6 ml	7 ml	8 ml	9 ml	10 ml
dH ₂ O	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	0 ml
4 × Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Saccharose (50 %)	2,25 ml	2,25 ml	2,25 ml	2,25 ml	2,25 ml	2,25 ml
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
APS (10 %)	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl

Tabelle 2.6:
Zusammensetzung der schweren
Acrylamidlösungen für
Gradientengele

2.17.7 Hochoflösende 2D Gelelektrophorese (Isoelektrische Fokussierung)

Für die Isoelektrische Fokussierung wurden die zu analysierenden Proteine in gefällter Form an die Firma IBA GmbH (Göttingen) geschickt. Dort wurden die Proben in 'Resolubilisation Buffer' (mit 8 M Harnstoff) aufgenommen, gegebenenfalls mit Hilfe von Vortex bzw. Ultraschall resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die so aufgearbeiteten Proteine auf 13 cm lange IEF-Streifen bei 140000 Vh im pH-Bereich von ca. pH 3 – 9 fokussiert und eingefroren.

Vor der Auftrennung über SDS-PAGE wurde der jeweilige Streifen 10 min lang in Äquilibrationpuffer mit 1 % DTT inkubiert.

2.17.8 Färbung von Gelen nach Gelelektrophorese

2.17.8.1 Färbung mit PageBlue™ Protein Staining Solution

Zur Anfärbung der in PAA-Gelen aufgetrennten Proteine wurde die PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Dazu wurden die Gele für mindestens 10 min in dH₂O gewässert, um das SDS zu entfernen und anschließend über Nacht in

der Färbelösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde überschüssige Farbe unter Schütteln und regelmäßigem Wechsel von dH₂O aus dem Gel entfernt.

2.17.8.2 Kolloidale Färbemethode mit Coomassie Brilliantblau G-250

Coomassie Brilliantblau G-250 ist eine - im Vergleich zu R-250 - methylsubstituierte Form und besitzt deshalb eine reduzierte Löslichkeit z.B. in 12 % Trichloressigsäure (TCA). Der Farbstoff kann daher unter sauren Bedingungen hauptsächlich als kolloidale Dispersion auf das Gel aufgebracht werden. Der gelöste Anteil führt zur Anfärbung der Proteine, während die Hauptmasse des kolloidalen Farbstoffes nicht in das Gel eindringen kann. Dies führt zu einer beinahe hintergrundfreien Anfärbung der Proteine, wodurch ein extensives Auswaschen von überschüssigem Farbstoff überflüssig ist (Neuhoff *et al.*, 1988).

Zum Färben der Proteine nach beschriebener Methode wurden die Gele zunächst für 1 h mit 12%iger TCA fixiert, anschließend für mindestens 8 h in der Färbelösung inkubiert und schließlich mit 25 % Methanol gespült. Die Gele wurden zur Fixierung und Stabilisierung in 20 % (NH₄)₂SO₄ aufbewahrt und getrocknet.

2.17.9 Massenspektrometrie von Proteinen

Voraussetzung für eine massenspektroskopische Untersuchung ist die Darstellung des Proteins in möglichst reiner Form. Aus einem komplexen Proteingemisch gelingt dies z.B. mit Hilfe von IEF und anschließender Auftrennung im SDS-PAGE. Die gewünschten Proteine können danach mittels Overlay detektiert und vorsichtig mit einem Skalpell aus dem PAA-Gel ausgeschnitten werden. Anschließend werden die Proteine aus der Gelmatrix isoliert und es wird ein enzymatischer Verdau mit selektiv spaltenden Proteasen (hier Trypsin) für 12 – 16 h bei 37 °C durchgeführt. Die Molekülmassen der Spaltfragmente wurden in einem ESI-QqTOF Massenspektrometer bestimmt und mit entsprechenden Datenbanken verglichen.

Der enzymatische Verdau sowie die massenspektrometrische Analyse

wurden im Analytischen Zentrallabor des Biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

2.17.10 'Western-Blot': Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel wurden diese nach der 'Semi-Dry'-Blot-Methode auf eine Nitrocellulosemembran (Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert (Kyhse-Anderson, 1984). Dazu wurde das kontinuierliche Puffersystem nach Bjerrum und Schafer-Nielsen (1986) verwendet, bei dem die Filterpapiere (Whatman Ltd., Maidstone, England) zwischen den Graphitelektroden mit einem einheitlichen Transferpuffer getränkt werden und als Pufferreservoir dienen.

Zwischen zwei Kohlenstoffplatten (Biometra Fast Blot, Göttingen) wird dabei ein homogenes elektrisches Feld erzeugt, welches bei hoher Feldstärke zu einem effektiven Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran führt.

Auf die Anode der Blotapparatur wurden zunächst 2 Lagen Filterpapier gelegt, auf welche dann die Nitrocellulosemembran, das PAA-Gel und schließlich zwei weitere Filterpapiere platziert wurden. Alle Komponenten wurden zuvor in Transferpuffer getränkt. Den äußeren Abschluss bildete die Kathode der Blotapparatur. Pro 1 cm² wurde eine Stromstärke von 1 mA angelegt. Nach ca. 1 - 1,5 h wurde der Proteintransfer beendet.

2.17.11 Overlay: Detektion mit Te-BSA-FITC

Für die Detektion Te-BSA-FITC-bindender Proteine wurde die geblottete Membran zunächst für 10 min in Maleinsäure-Waschpuffer gewaschen, bevor sie 30 min lang in Renaturierungspuffer inkubiert und anschließend 20 min in Blockierungslösung geschüttelt wurde. Durch die Blockierungslösung sollten unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden. Nach dem Blocken wurde ein weiteres Mal mit Maleinsäure-Waschpuffer gewaschen und die Membran dann für 2 h

mit dem in Maleinsäurepuffer verdünnten Liganden schüttelnd inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten folgte eine Inkubation mit einem Antifluorescein-AP-Antikörper (1:1000 in Maleinsäurepuffer verdünnt) und ein letztes Waschen. Um eine Äquilibration der Membranen zu erreichen, wurden diese als Vorbereitung für die Detektion 5 min in Detektionspuffer inkubiert. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Membranen dann aus der Lösung entfernt, nach kurzem Abtropfen auf einer Folie platziert und mit 1 ml in Detektionspuffer verdünntem CDP-Star überschichtet. Die Reaktion wurde mit einer zweiten Folie abgedeckt, damit sich der Flüssigkeitsfilm gleichmäßig verteilen konnte. Luftblasen wurden durch kräftiges Drüberstreichen entfernt.

Die Exposition erfolgte auf einem Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film (Roche, Mannheim) für 2 bis 24 h. Zum Entwickeln wurde der Film für 1 – 5 min in Entwicklerlösung überführt. Nach einem kurzen Wässerungsschritt in einem VE-Wasserbad wurde der Film in Fixierlösung so lange fixiert, bis ein klarer Hintergrund zu erkennen war. Um keine Flecken auf dem Film zu erhalten, wurde dieser vor dem Trocknen erneut gewässert.

2.17.12 Overlay: Detektion mit Te-BSA

Zur Vorbereitung der Reaktion wurde die Membran zunächst für 10 min mit Maleinsäure-Waschpuffer inkubiert, dann 30 min mit Blockierungslösung geblockt und erneut 10 min lang gewaschen. Der Blot wurde im Anschluss für 3 - 4 h mit Te-BSA (10 µg/ml in Maleinsäurepuffer) inkubiert, danach 8 × 5 min gewaschen und für eine weitere Stunde mit dem Antikörper (Mab to Testosterone, 1:5000 in Maleinsäurepuffer verdünnt) behandelt. Nach weiteren Waschschrritten (6 × 5 min) folgte wieder eine einstündige Inkubation mit einem HRP-gekoppeltem Zweitantikörper (Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit anti-Mouse IgG, 1:2000). Um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran erneut 2 × 5 min und 2 × 10 min gewaschen, dann erfolgte die Detektion des Zweitantikörpers mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham, Freiburg). Dazu wurden Lösungen A und B direkt vor Zugabe zum Blot zu gleichen Teilen gemischt und die Membran 1 min lang schüttelnd in diesem Ansatz inkubiert. Abschließend wurde die

Membran kurz mit Waschpuffer abgespült und luftblasenfrei zwischen zwei Folien in eine Filmkassette zur Exposition überführt.

Die Exposition erfolgte auf einem ECL-Hyperfilm (Amersham, Freiburg) für 1 bis 5 min.

2.17.13 Metabolische Markierung von Makrophagen mit TRAN³⁵S-LABELTM und anschließende Proteinanalyse

Zellen mit 60 - 70%iger Konfluenz wurden mit je 5 ml Medium ohne Cystein gewaschen und danach über Nacht in 10 ml Medium mit Cystein und 100 µCi TRAN³⁵S-LABELTM inkubiert. Um die vom Cystein gebildeten, flüchtigen radioaktiven Mercaptane abzufangen, wurden die Kulturschalen in mit Aktivkohle gefüllte Glasschalen gestellt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag wurden die markierten Zellen für 10 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und anschließend 3 mal mit 50 ml PBS⁻ gewaschen. Danach wurde das Pellet in PBS⁻ (100 µl pro eingesetzter Kulturschale) aufgenommen. Pro 100 µl Probe wurden die gleiche Menge Testosteron-BSA zugegeben und der Ansatz entweder 1 h lang auf Eis oder für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut mit PBS⁻ (2 × 1 ml) gewaschen und anschließend wieder in 100 µl PBS⁻ aufgenommen. Um die Bindung des Testosterons zu verstärken wurde ein sogenannter Crosslinker (4 - 8 µl 25 mM DSP) eingesetzt. Dieser reagiert mit primären Aminen und verursacht eine kovalente Amid-Bindung. Um die Reaktion zu stoppen wurden nach einer 2stündigen Inkubation auf Eis 2 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) zugegeben und für weitere 15 min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen bei 14.000 rpm für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Lysispuffer und 120 µl Proteinase Inhibitor (Complete Protease Inhibitor, Roche, Mannheim) resuspendiert. Nach der Lyse-Reaktion wurde die Probe über Nacht bei - 20 °C gelagert.

Am folgenden Tag wurde das Zelllysats aufgetaut und bei 14.000 rpm 10 min zentrifugiert. 10 µl anti-BSA-Agarose wurden zunächst in 1 ml PBS⁻ gewaschen, bevor 500 µl des Lysats auf die Agarose gegeben und dieses Gemisch 1 h rotierend inkubiert wurde. Nach dieser Inkubation wurde wieder 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, dann wurde das Pellet

erst mit 1 ml PBS⁻ und 120 µl Protease Inhibitor, danach mit 1 ml PBS⁻ gewaschen. Die Proben wurden mit Ladungspuffer versetzt, denaturiert (*Kapitel 2.17.5*) und anschließend über ein 10%iges SDS-Gel (*Kapitel 2.17.6*) aufgetrennt.

Vom Gel wurde die Markerspur abgetrennt und gefärbt, während der Rest 30 min bzw. über Nacht bei RT in Fixierlösung inkubiert wurde. Das Gel wurde 15 - 30 min in AmplifyTM Fluorographic Reagent (Amersham, Freiburg) geschüttelt, bevor Gel und Markerspur getrocknet wurden.

Für die Autoradiographie zur Detektion des markierten Methionins wurden Biomax MR Scientific Imaging Filme aufgelegt und mit einer Verstärkerfolie (Biomax MR Screen) in einer Metall-Film-Kassette bei - 80 °C exponiert.

2.17.14 Vesikelisolation mit dem MACS-System

Für die Vesikelisolation mit dem MACS-System wurden zunächst 50 µl anti-FITC-Beads mit 400 µl Testosteron-BSA-FITC und 50 µl PBS⁻ versetzt und für 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Gleichzeitig wurden kultivierte Makrophagen in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt und für 10 min bei 200 × g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde 3 mal mit 50 ml PBS⁻ gewaschen und anschließend in 1 ml Waschlösung resuspendiert. Die Testosteron-BSA-FITC gekoppelten anti-FITC-Beads wurden zugegeben und der Ansatz weitere 60 Minuten unter vorsichtigem Schütteln bei 37 °C inkubiert, um die Aufnahme des Testosteron-Konjugat-Beads Komplexes über Endocytose zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen erneut 3 mal mit PBS⁻ gewaschen und dann in Hypotonischem Puffer aufgenommen. Mit Hilfe eines Glas-Teflon-Potters wurden die Zellen homogenisiert. Dem resultierenden Homogenat wurde 1 Volumen Tris/Sucrose/MgCl₂-Puffer zugesetzt, bevor es für 10 min bei 500 × g zentrifugiert wurde.

Eine MS⁺-MACS-Säule wurde dreimal mit 500 µl Tris/BSA gewaschen. Dann wurden die magnetisch markierten Zellbestandteile auf die Säule gegeben (MiniMacs Separation Columns, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und diese 5 mal mit 500 µl Tris/BSA gewaschen. Anschließend wurde die Säule auf ein entsprechendes Auffanggefäß gestellt. Mit 1 ml Tris/BSA-Puffer und unter zu Hilfenahme eines Kolbens

(im Kit enthalten) wurde die Positivfraktion von der Säule gespült.

Die so gewonnene Fraktion wurde für die SDS-PAGE vorbereitet (*Kapitel 2.17.5*) und über ein kleines 10%iges Gel aufgetrennt (*Kapitel 2.17.6*).

Das Gel wurde mit Hilfe des Silverstaining Kits (Amersham, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gefärbt.

3.0 Ergebnisse

Neben der bereits seit langem bekannten genomischen Wirkung von Steroidhormonen über klassische Rezeptoren, wie beispielsweise den im Cytoplasma sowie im Zellkern lokalisierten Androgenrezeptor (Zhou *et al.*, 1994), wurden in den letzten Jahren immer mehr Arbeiten über die sogenannten nicht-genomischen Effekte dieser Hormone publiziert.

Diese nicht-genomischen Effekte unterscheiden sich von den genomischen besonders durch ihre Reaktionszeit. Während beim transkriptionellen Weg bereits die Verlagerung des klassischen Rezeptors in den Zellkern oft zwischen 30 und 60 Minuten beansprucht, erfolgen die nicht-genomischen Steroidantworten bereits innerhalb weniger Sekunden bzw. Minuten. Bisher ist bekannt, dass viele dieser schnellen Reaktionen über Signalwege vermittelt werden, die mit Membranrezeptoren assoziiert sind, wie beispielsweise G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCRs), Ionenkanälen oder Enzymgekoppelten Rezeptoren (Watson, 1999). So konnten nicht-genomische Effekte z.B. bei der murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 nachgewiesen werden. Das besondere an diesen Zellen ist, dass sie keinen klassischen Androgenrezeptor exprimieren, eine Stimulation mit Testosteron aber dennoch zu nachweisbaren Effekten, wie einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt (Guo *et al.*, 2002b). Nach Inkubation der RAW 264.7 Makrophagen mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Testosteron-Konjugat Te-BSA-FITC können spezifische Bindungsstellen für das Hormon an der Oberfläche der Zellmembran detektiert werden. Diese Bindungsstellen werden als membranständiger Androgenrezeptor (mAR) bezeichnet (Benten *et al.*, 1997, 1999a, 1999b). Bisher konnte dieser membranständige Rezeptor allerdings noch nicht isoliert und charakterisiert werden. Auch bleibt nach wie vor die Frage, ob er tatsächlich für die Initiierung der nicht-genomischen Effekte in dieser Zelllinie verantwortlich ist.

Mit Hilfe verschiedener Methoden wurde im Zuge der Arbeit versucht, den mAR zu isolieren bzw. den Ursprung der nicht-genomischen Steroideffekte in RAW 264.7 Makrophagen aufzuklären.

3.1 Expressionsanalysen

Da die RNA der zu untersuchenden murinen RAW 264.7 Makrophagen für die Konstruktion einer λ -Phagenbank verwendet werden sollte, mussten zunächst die Expression des membranständigen (mAR) sowie die nicht vorhandene Expression des klassischen Androgenrezeptors (iAR) untersucht und bestätigt werden.

3.2 Analyse der mAR-Expression mit Te-BSA-FITC

Die auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesäten Makrophagen wurden entweder für 1, 5 oder 15 Minuten mit Te-BSA-FITC inkubiert; dabei handelt es sich um ein an BSA und einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes Testosteron-Konjugat. Anschließend wurden die Zellen auf einem Objektträger fixiert und die Expression des mAR mittels Analyse am Konfokalen Laserscanning Mikroskop überprüft. Die Eigenfluoreszenz der Zellen wurde mit Hilfe einer unbehandelten Kontrolle bestimmt.

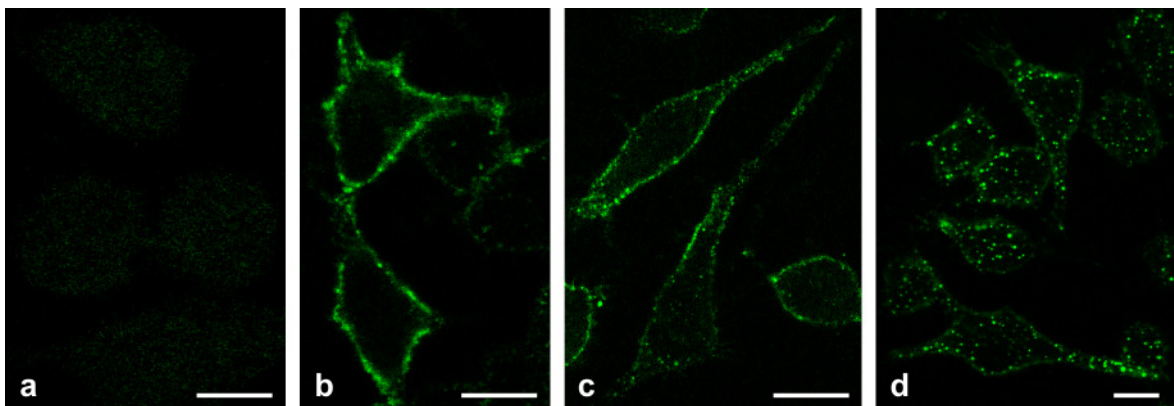


Abbildung 3.1:

Nachweis der Expression Testosteron-spezifischer Bindungsstellen auf der Oberfläche von RAW 264.7 Makrophagen. Die verwendeten Zellen wurden unterschiedlich lange mit einem Te-BSA-FITC-Konjugat inkubiert und anschließend mit Hilfe des CLSM untersucht. (a) zeigt die unbehandelte Kontrolle, (b) 1minütige Inkubation mit Te-BSA-FITC, (c) 5 Minuten Inkubation mit Te-BSA-FITC, (d) 15 Minuten Inkubation mit Te-BSA-FITC. Der Maßstabbalken markiert eine Länge von 10 μ m.

In *Abbildung 3.1 a - d* wird deutlich, dass der Te-BSA-FITC-Komplex mit zunehmender Inkubationszeit internalisiert wird. Während nach einer einminütigen Inkubation die Fluoreszenz ausschließlich an der Außenseite der Zellmembran zu finden ist, zeigt sich bereits nach fünf

Minuten, dass das Testosteron-BSA-FITC-Konjugat ins Innere der Zelle transportiert wird. Bereits nach 15 Minuten kann man deutlich kleine, Fluoreszenzfarbstoff-enthaltende Vesikel im Cytoplasma der Makrophagen erkennen.

3.3 Analyse der iAR-Expression mittels RT-PCR

Da die fehlende Expression des klassischen Androgenrezeptors in den RAW 264.7 Makrophagen eine Voraussetzung für die Verwendung der Zelllinie in allen geplanten Experimenten war, wurde eine RT-PCR-Analyse mit verschiedenen in *Tabelle 2.1* zusammengestellten Primerpaaren durchgeführt. Mit den Primerpaaren ARS1, ARS2 und ARS3 sollten drei verschieden große Fragmente (365, 560 bzw. 281 bp) aus der steroidbindenden Domäne, mit dem Primerpaar ARD1 ein 511 bp großes Fragment der DNA-bindenden Domäne des klassischen Androgenrezeptors amplifiziert werden. Parallel wurde die Expression der klassischen Estrogenrezeptoren ER α und ER β untersucht, wobei mit Hilfe der Primerpaare ER α S1 bzw. ER α S2 zwei Fragmente (385 bzw. 608 bp) der steroidbindenden Domäne des klassischen Estrogenrezeptor α und mit dem Primerpaar ER β S1 zwei jeweils 542 und 578 bp große Fragmente der steroidbindenden Domäne des klassischen Estrogenrezeptor β amplifiziert werden sollten. Bei den beiden ER β -Fragmenten handelte es sich um zwei sogenannte 'Splice'-Varianten (Benten *et al.*, 2001, Guo *et al.*, 2002a). Zu jedem Reaktionsansatz wurden entsprechende Kontrollen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde aus dem Uterus bzw. der Leber gewonnene RNA von BALB/c-Mäusen verwendet. Über zwei Negativkontrollen (jeder Reaktionsansatz einmal ohne RNA-'Template' bzw. ohne Enzym) wurde eine Kontamination der verwendeten Einzelsubstanzen ausgeschlossen. Als Enzym für die RT-Reaktion wurde die Reverse Transkriptase M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) verwendet. Nach der anschließenden PCR-Reaktion wurden alle Proben über ein Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

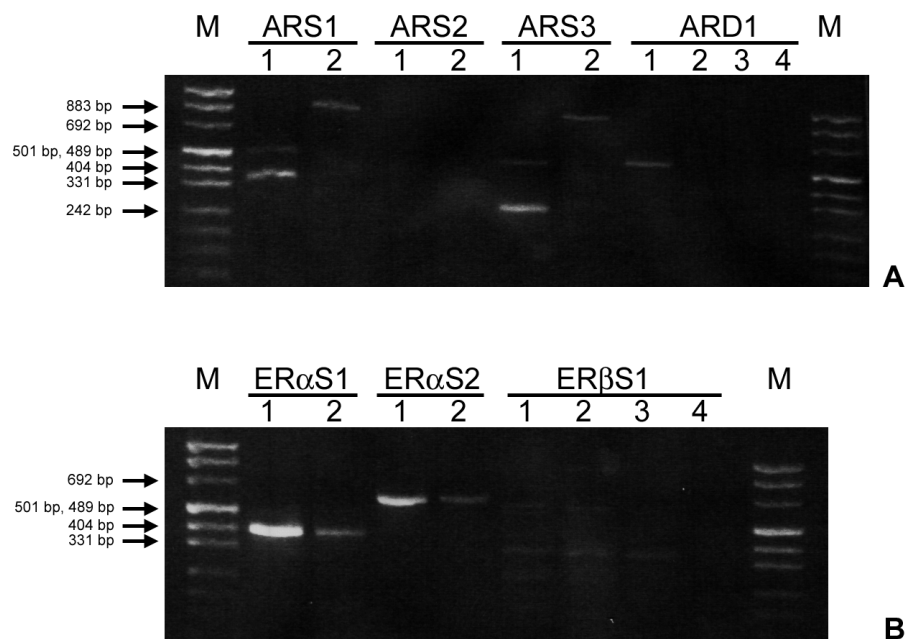


Abbildung 3.2:

(A) Analyse der mit den Primerpaaren ARS1, ARS2, ARS3 und ARD1 amplifizierten Produkte.

Um die nicht vorhandene Expression des iAR in den RAW 264.7 Makrophagen sicherzustellen, wurde eine RT-PCR mit verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Leber-RNA aus BALB/c-Mäusen. Als DNA-Längenstandard (M) wurde jeweils 1 µg pUC-Mix-Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. In den mit (1) gekennzeichneten Spuren wurden jeweils Reaktionsansätze mit Leber-RNA als Positivkontrolle, in den mit (2) markierten Spuren Reaktionsansätze mit RAW 264.7-RNA aufgetragen. Die mit (3) und (4) beschrifteten Spuren dienen als Negativkontrollen. In der mit (3) markierten Spur (Reaktionsansatz versetzt mit RAW 264.7-RNA) wurde auf das Enzym, in der mit (4) markierten Spur auf die RNA verzichtet. **(B) Analyse der mit den Primerpaaren ERαS1, ERαS2 und ERβS1 amplifizierten Produkte.** Um die Expression des ERα- bzw. ERβ-Rezeptors in RAW 264.7 Makrophagen zu überprüfen, wurde eine RT-PCR mit verschiedenen Primern durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Uterus-RNA aus BALB/c-Mäusen. Die beiden aus der Uterus-RNA amplifizierten, dicht nebeneinander liegenden ERβ-Fragmente sind nur sehr schwach zu erkennen. Als DNA-Längenstandard (M) wurde jeweils 1 µg pUC-Mix-Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. In den mit (1) markierten Spuren wurden jeweils Reaktionsansätze mit Uterus-RNA als Positivkontrolle, in den mit (2) gekennzeichneten Spuren Reaktionsansätze mit RAW 264.7-RNA aufgetragen. Die mit (3) und (4) beschrifteten Spuren dienen als Negativkontrolle. In der mit (3) markierten Spur (Reaktionsansatz versetzt mit RAW 264.7-RNA) wurde auf das Enzym, in der mit (4) markierten Spur auf die RNA verzichtet.

Wie in *Abbildung 3.2 (A)* zu erkennen, konnten mit Ausnahme des 560 bp großen ARS2-Fragments alle gewünschten Abschnitte des Androgenrezeptors aus der als Positivkontrolle verwendeten Leber-RNA amplifiziert werden. Die Größen der detektierten Produkte lagen für jedes Primerpaar im erwarteten Bereich. Allerdings ließ sich das Fragment aus der DNA-bindenden Domäne des Androgenrezeptors (ARD1) schlechter amplifizieren, als die zwei Fragmente der steroidbindenden Domäne (ARS1 bzw. ARS3), was sich an der relativ schwachen Bande von ARD1 zeigt. In den Reaktionsansätzen mit der zu analysierenden Makrophagen-RNA konnte keines der vier Androgenrezeptor-Fragmente amplifiziert werden. Allerdings trat bei diesen Reaktionen eine Bildung unspezifischer Produkte auf. Da aber in keiner der durchgeführten

Negativkontrollen eine Amplifikation stattgefunden hat, kann eine Kontamination als Grund für das Auftreten der unspezifischen Fragmente ausgeschlossen werden.

Bei der Analyse der ER-Fragmente in *Abbildung 3.2 (B)* konnte festgestellt werden, dass sich die ER α S1- bzw. ER α S2-Fragmente sowohl aus der als Positivkontrolle verwendeten Uterus-RNA wie auch aus der zu untersuchenden RAW 264.7-RNA amplifizieren ließen. Es ist jedoch zu erkennen, dass der Expressionslevel des Estrogenrezeptors α in den Makrophagen offensichtlich deutlich geringer ist, als im Uterus, da die entsprechenden Fragmente auf dem Gel nur sehr schwach nachzuweisen sind. Im Gegensatz dazu wird der Estrogenrezeptor β zwar im Uterus, nicht aber von RAW 264.7 Makrophagen exprimiert. Die in der Positivkontrolle amplifizierten Produkte entsprechen den erwarteten Größenvorstellungen, allerdings sind auch hier nur schwache Banden zu erkennen.

Um die vor allem bei der Amplifikation der Fragmente des klassischen Androgenrezeptors aufgetretenen unspezifischen Produkte zu minimieren, wurde die RT-Reaktion mit dem Enzym Reverse Transkriptase AMV (Avian Myeloblastosis Virus) wiederholt.

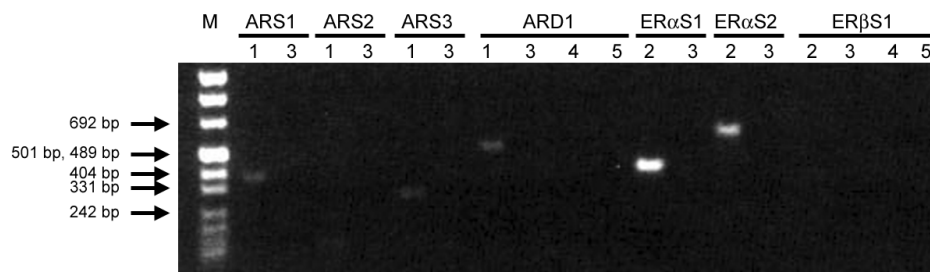


Abbildung 3.3:

Analyse der amplifizierten iAR- bzw. ER α - und ER β -Produkte der mit Hilfe der Reversen Transkriptase AMV durchgeführten RT-PCR-Reaktionen. Um die Amplifikation unspezifischer Produkte zu reduzieren, wurde in diesem Ansatz statt des Enzyms M-MLV die Reverse Transkriptase AMV eingesetzt. Als Positivkontrolle diente Leber-RNA bzw. Uterus-RNA aus BALB/c-Mäusen. Als DNA-Längenstandard (M) wurde 1 μ g pUC-Mix-Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. In den mit (1) und (2) gekennzeichneten Spuren wurden jeweils Reaktionsansätze mit Leber-RNA bzw. Uterus-RNA als Positivkontrolle, in den mit (3) markierten Spuren Reaktionsansätze mit RAW 264.7-RNA aufgetragen. Die mit (4) und (5) beschrifteten Spuren dienen als Negativkontrollen. In der mit (4) markierten Spur (Reaktionsansatz mit RAW 264.7-RNA) wurde auf das Enzym, in der mit (5) markierten Spur auf die RNA verzichtet.

Die Verwendung dieses Enzyms führte zwar zu einer vollständigen Eliminierung der zuvor aufgetretenen unspezifischen Produkte, allerdings war es auch mit Hilfe der AMV-Reversen Transkriptase nicht möglich, das Fragment ARS2 zu amplifizieren. Auch die zuvor mit dem Enzym M-

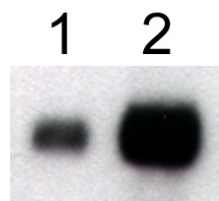
MLV aus der Makrophagen-RNA amplifizierten Fragmente ER α S1 und ER α S2, ebenso wie die zwei ER β S1-Fragmente aus der Positivkontrolle konnten in diesem Ansatz nicht reproduziert werden (siehe *Abbildung 3.3*).

3.4 Konstruktion und 'Screening' einer Lambda-Phagenbank

3.4.1 Konstruktion einer λ -Phagenbank

Für die Herstellung der λ -Phagenbank wurde mittels 'Dynabeads Oligo (dT)₂₅' Poly(A⁺)-RNA aus RAW 264.7 Makrophagen Gesamt-RNA aufgereinigt. Da die gewonnene Poly(A⁺)-RNA für die Konstruktion einer cDNA-Bibliothek mit Hilfe des 'SMART™ cDNA Library Construction Kits' verwendet werden sollte, musste zunächst eine einwandfreie Qualität sichergestellt werden. Die Qualitätskontrolle erfolgte über einen Northern Blot, der mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert wurde. Nach Exposition auf einem Biomax MS Scientific Imaging Film zeigte sich je Probe eine distinkte Bande, was die Qualität der aufgereinigten Poly(A⁺)-RNA bestätigte (siehe *Abbildung 3.4*). Es waren keinerlei Degradationsprodukte der GAPDH-mRNA nachweisbar.

Abbildung 3.4: Qualitätskontrolle der mittels 'Dynabeads Oligo (dT)₂₅' isolierten Poly(A⁺)-RNA im Northern-Blot. Die Hybridisierung der Gesamt-RNA (1) bzw. der isolierten Poly(A⁺)-RNA (2) erfolgte mit einer GAPDH-Sonde.



3.4.2 Konstruktion einer cDNA-Bibliothek mit Hilfe des 'SMART™ cDNA Library Construction Kits'

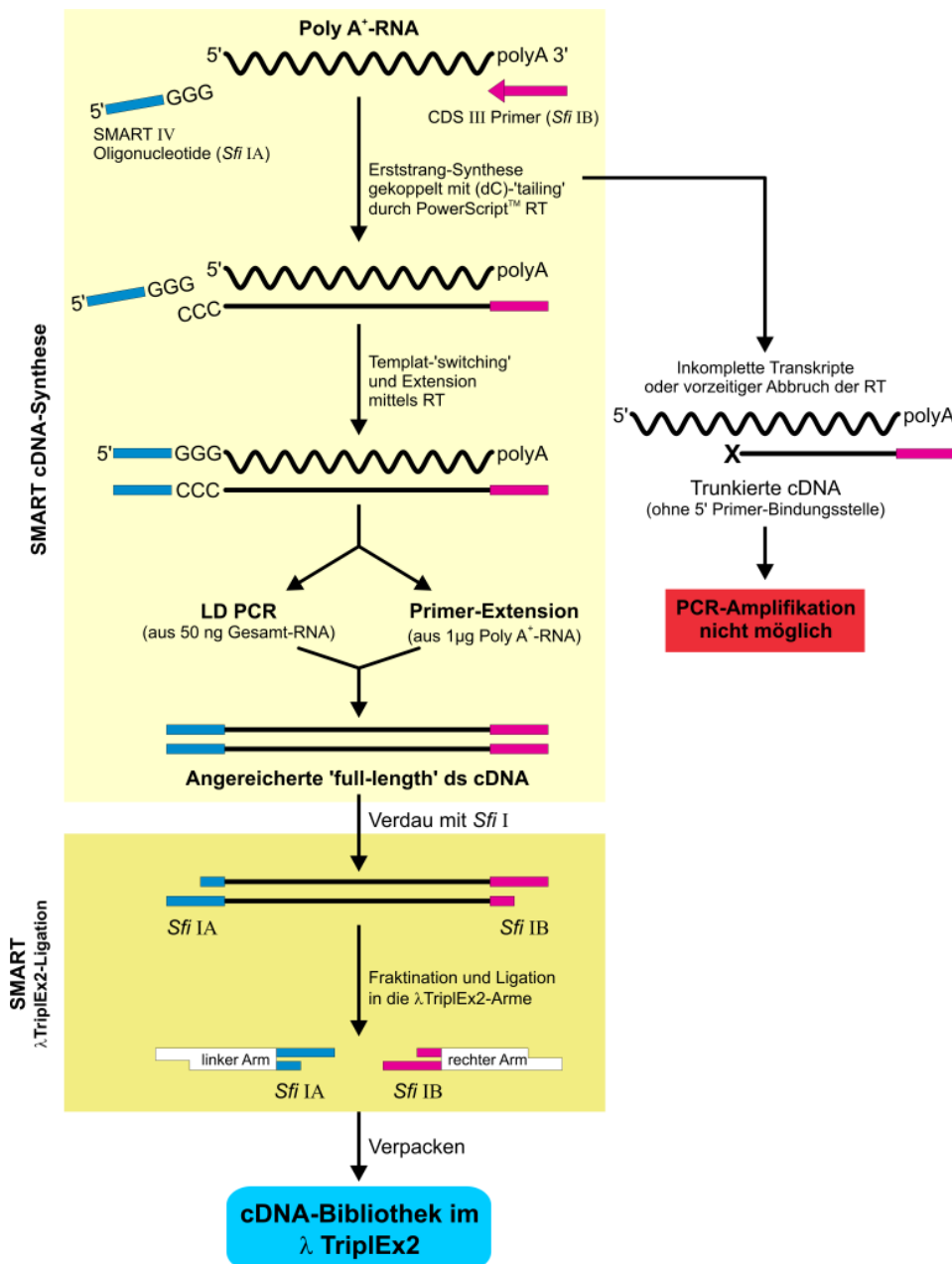
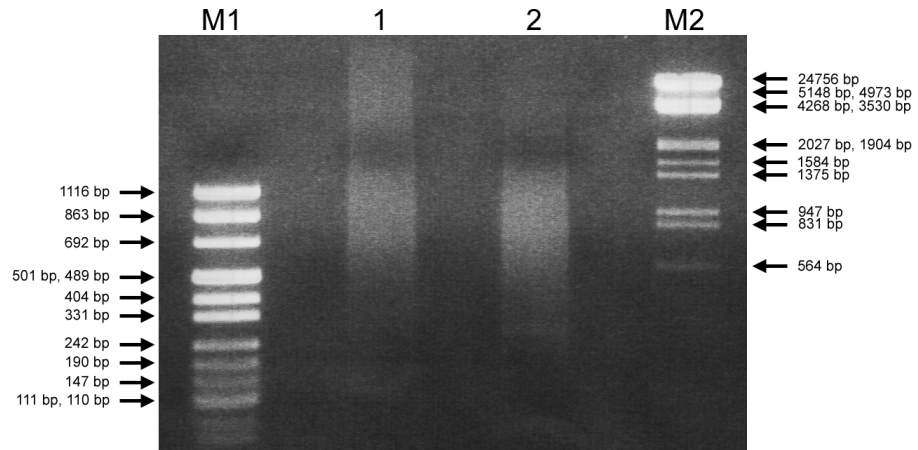


Abbildung 3.5: Übersichtsskizze des 'SMART™ cDNA Library Construction Kit' Protokolls

Der Ausgangspunkt für die Konstruktion der cDNA-Bibliothek ist das Umschreiben der eingesetzten mRNA in doppelsträngige cDNA. Dies geschieht im Zuge einer Reversen Transkription mit anschließender 'Long Distance' (LD)-PCR-Reaktion. Um die Qualität der Amplifikation und der gewonnenen cDNA überprüfen zu können, wurde gleichzeitig eine Positivkontrolle mit der im Kit enthaltenen Kontroll Poly(A⁺)-RNA aus humaner Plazenta durchgeführt. Je ein Aliquot wurde anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

Abbildung 3.6:

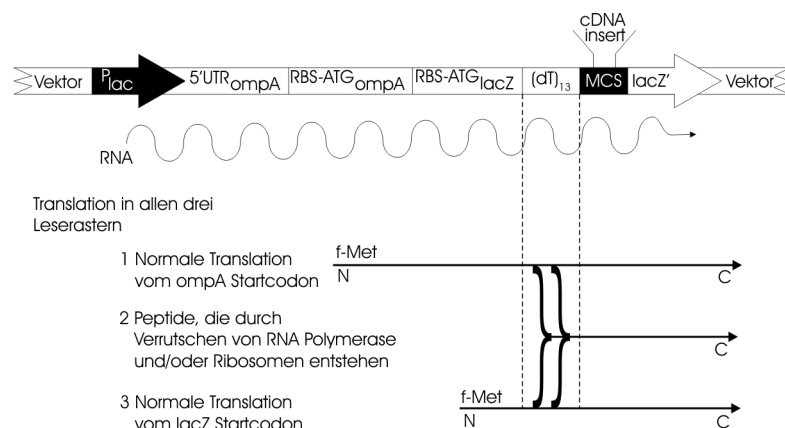
Qualitätskontrolle der mittels 'SMART™ cDNA Library Construction Kit' hergestellten cDNA. Als DNA-Größenstandards (M1 bzw. M2) wurden jeweils 1 µg pUC-Mix Marker bzw. λDNA/ *EcoRI*+*HindIII* Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Die mit (1) markierte Spur zeigt die mit Kontroll-Poly(A⁺)-RNA durchgeführte Positivkontrolle, die mit (2) markierte Spur zeigt die aus RAW 264.7 Poly(A⁺)-RNA gewonnene cDNA.



Es zeigt sich, dass die Reaktion erfolgreich war, da sowohl in der Positivkontrolle als auch in der eigentlichen Probe ein deutlicher DNA-‘Schmier’ detektiert werden konnte (*Abbildung 3.6*). Dieser ‘Schmier’ verdeutlicht, dass viele verschiedene Fragmente in völlig unterschiedlichen Größenordnungen amplifiziert wurden. Die Größenverteilung der Fragmente ist ein kritischer Punkt für die erfolgreiche Konstruktion einer repräsentativen cDNA-Bibliothek. Die gewonnene cDNA wurde Proteinase K und *SfiI* verdaut und anschließend über eine Chroma SPIN-400 Säule größenfraktioniert. Ein Aliquot jeder aufgefangenen Fraktion wurde dann über ein 1,1%iges Agarosegel für 10 min bei 150 V aufgetrennt. Die ersten vier cDNA-enhaltenden Fraktionen wurden vereinigt und für die Ligation verwendet.

Abbildung 3.7:

Schematische Darstellung des verwendeten Phagenvektors λTriplEx2. Durch den speziellen Aufbau dieses Vektors können Polypeptide aus allen drei Leserastern synthetisiert werden.



Das besondere am Phagenvektor λTriplEx2 sind seine zwei Startpunkte für die Translation in verschiedenen Leserastern, ebenso wie seine sogenannte ‘slip site’, eine Gruppe von dTs, an welchen die Ribosomen das Leseraster wechseln können. Diese ‘slip site’ ist zwischen dem *lac* Promotor und der ‘Multiple Cloning Site’ (MCS) lokalisiert. Diese (dT)₁₃-

Region führt zu Deletionen durch ungenaue Transkription und daher zu Expression eines anderen 'open reading frames' (ORF). Während der Translation befindet sich jeweils etwa ein Drittel der Ribosomen im gleichen Leseraster. So entsteht, unabhängig von der Klonierung des Inserts in den Vektor, ein funktionsfähiges Produkt.

Nach der Ligation wurden alle Ansätze *in vitro* in λ -Phagen verpackt. Um den Titer der so gewonnenen Phagensuspension zu bestimmen, wurden XL1-Blue Zellen infiziert und in unterschiedlichen Verdünnungen ausplattiert. Da die Ausbeute der Phagenklone erhöht werden sollte, wurden weitere Ligationen angesetzt und diese anschließend vereinigt.

Ligation	pfu
1. Ligation	202.000
2. Ligation	362.500
3. Ligation	160.000
4. Ligation	152.500
5. Ligation	162.500
6. Ligation	3.560.000
Σ	4.599.500

Tabelle 3.1:
Gesamtausbeute der in verschiedenen Ligations- bzw. Verpackungsansätzen gewonnenen Phagen.

Die so konstruierte Primärbank bestand aus ca. $4,6 \times 10^6$ Einzelklonen. Eine Bank mit 1×10^6 unabhängigen Klonen ist bereits repräsentativ. Von 20 testweise geschnittenen Klonen enthielten 100 % ein Insert < 600 bp.

3.4.3 Sequenzanalyse

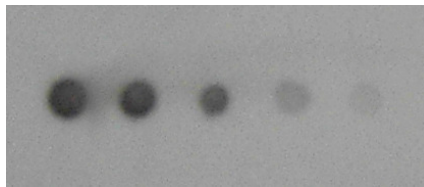
Die DNA einiger zufällig ausgewählter Phagenplaques wurde isoliert und sequenziert, um die Qualität der konstruierten Bibliothek und der enthaltenen cDNA-'Inserts' zu überprüfen. Die gewonnenen Daten wurden unter Verwendung des Programms BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ausgewertet. Die sequenzierten, im Schnitt ca. 700 kb großen Fragmente, wiesen eine wenigstens 95%ige Übereinstimmung mit Sequenzen von *Mus musculus* auf, wobei die Abweichung von 5 % auf Sequenzierfehler zurückzuführen ist.

3.4.4 'Screening' der Primärbank

Zunächst musste die Sensitivität des Liganden-detektierenden Antikörpers unter Versuchsbedingungen getestet werden. Dafür wurden zunächst verschiedene Te-BSA-FITC-Konzentrationen (1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg und 500 fg) auf eine Nylonmembran pipettiert, dann mit dem zu testenden Anti-Fluorescein-AP-Antikörper inkubiert und anschließend mit Hilfe des Chemiluminiszenz-Systems CSPD detektiert. Es zeigt sich, dass es mit Hilfe des Antikörpers möglich ist, auch sehr niedrige Konzentrationen des Te-BSA-FITC-Liganden zu detektieren, da auch bei 500 fg noch ein Signal erkennbar ist (*Abbildung 3.8*).

Abbildung 3.8:

Mit Hilfe des Anti-Fluorescein-AP-Antikörpers detektierte Te-BSA-FITC-Verdünnungsreihe.
Eingesetzte Konzentrationen von links nach rechts: 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 500 fg.



Diese hohe Sensitivität ist wichtig, da sich positive Einzelklone sonst nicht von oft auftretenden unspezifischen Signalen unterscheiden ließen. Außerdem ist nicht bekannt, welche Menge des Liganden an die Oberfläche eines positiven Klons bindet.

Für das eigentliche 'Screening' wurden XL1-Blue Zellen mit 20.000 Phagen pro 10 cm Platte infiziert, ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques auf Nylonmembranen abgeklatscht, diese mit dem Te-BSA-FITC-Liganden inkubiert und anschließend detektiert. Auf diese Weise sollten Phagen isoliert werden, die spezifisch Testosteron-bindende Proteine exprimierten. Die *Abbildung 3.9* zeigt exemplarisch drei während der Analyse der ersten Runde entstandene Filme mit unterschiedlich starken Signalen.

Da die verwendeten RAW 264.7 Makrophagen, wie in vorherigen Experimenten gezeigt, einen klassischen Estrogenrezeptor exprimieren, wurden die Platten ein zweites Mal abgeklatscht und die Membranen mit E₂-BSA-FITC inkubiert. Dieser Ansatz sollte als Positivkontrolle dienen.

Die Größe eines positiven Spots sollte in etwa mit der Ausdehnung des entsprechenden abgeklatschten Phagenklons im Top-Agar übereinstimmen. Weiterhin zeichnen sich positive Klone durch diffuse Signale aus (siehe *Abbildung 3.9 A* und *Abbildung 3.10 B*, umrandete Areale). Daher können scharf umrissene sowie sehr kleine Spots sofort

als unspezifische Klone erkannt und so von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden.

Ein großer Nachteil der Methode war der oftmals großflächig an der Membran verbleibende Top-Agar, da dieser starke unspezifische Signale bei der Detektion verursachte (siehe *Abbildung 3.9 B*). Diese starken Signale überstrahlten teilweise den ganzen Film und machten so eine Detektion von möglichen positiven Klonen sehr schwer. Versuche, die unspezifischen Signale zu reduzieren, blieben erfolglos.

Alle Klone der Primärbank wurden 'gescreent' und dabei 25 möglich positive Klone für Testosteron sowie 7 für Estradiol isoliert. Die identifizierten Plaques wurden ausgestochen und die Phagen isoliert. Die positiven Klone sollten in einer zweiten 'Screening'-Runde angereichert und vereinzelt werden. Dazu wurden erneut XL1-Blue Zellen mit den möglich positiven Phagen infiziert und in einem Maßstab von nur noch 2.000 Phagen pro 10 cm Agar-Platte ausplattiert. In der zweiten Runde konnten weder für Testosteron noch für Estradiol positive Klone detektiert werden.

3.5 Aufreinigung von Te-BSA-FITC-mAR-Komplex enthaltenden Vesikeln mittels MACS

Die Bindung von Te-BSA-FITC an den membranständigen Androgenrezeptor löst eine Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes aus. Bereits nach 15 Minuten sind fluoreszierende Vesikel im Cytoplasma detektierbar (Benten *et al.*, 1997, 1999a, 1999b). Diese Vesikel sollten mit dem MACS-System (Magnetic Cell Sorting System) angereichert und mittels SDS-PAGE analysiert werden.

Mit Hilfe des MACS-Systems ist es möglich, Zellen mit bestimmten Oberflächenmerkmalen anzureichern. Dazu werden die Zellproben mit kleinen magnetischen Partikeln inkubiert, an deren Oberfläche ein spezifisch gegen das gewünschte Merkmal gerichteter Antikörper gekoppelt ist. Anschließend können die vom Antikörper als positiv detektierten Zellen über eine Säule im magnetischen Feld isoliert werden.

Angelehnt an die beschriebene Methode sollten die den Ligand-mAR-Komplex enthaltenden Vesikel aufgereinigt werden. Dafür wurde

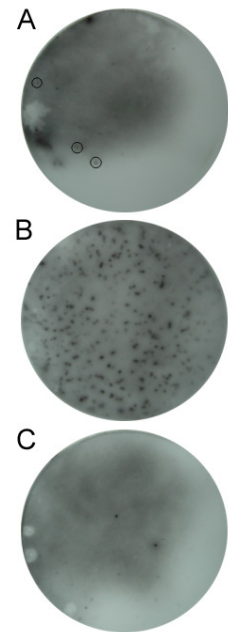


Abbildung 3.9: Drei exemplarisch ausgewählte Filme des Te-BSA-FITC-Screenings mit unterschiedlichen Signalen. Der mit (A) markierte Film zeigt umkreist drei möglicherweise positive Klone, (B) zeigt einen Film mit starken unspezifischen Signalen, (C) zeigt einen Film mit vereinzelt unspezifischen Signalen.

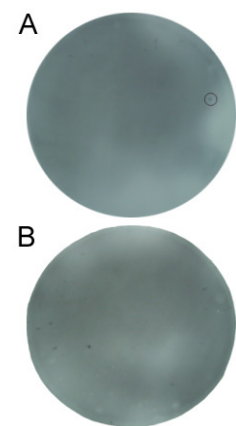


Abbildung 3.10: Zwei repräsentative Filme des E₂-BSA-FITC-Screenings. Im Vergleich zum Screening mit Te-BSA-FITC gab es kaum unspezifische Signalbildung (B). Der mit (A) gekennzeichnete Film zeigt umkreist einen möglicherweise spezifisch Estradiol-bindenden Klon.

zunächst der Ligand mit Anti-FITC-Microbeads komplexiert und anschließend die zu untersuchenden Zellen mit dem entstandenen Komplex inkubiert. Um die internalisierten Vesikel aufzureinigen zu können, wurden die Zellen homogenisiert und das Homogenat über das beschriebene MACS-Säulen System aufgearbeitet. Die resultierende Fraktion konnte dann mittels SDS-PAGE analysiert werden; allerdings war außer der Markerspür kein Protein auf dem Gel detektierbar.

3.6 Immunpräzipitation metabolisch markierter Proteine

Um den membranständigen Androgenrezeptor mittels Immunpräzipitation isolieren zu können, wurden RAW 264.7 Makrophagen zunächst über Nacht mit radioaktiv markiertem Methionin/Cystein versetzt und anschließend mit einem Te-BSA-Konjugat inkubiert. Die Verbindung zwischen Ligand und Rezeptor wurde mit Hilfe von DSP, einem wasserunlöslichen 'Crosslinker', kovalent fixiert. Die so behandelten Zellen wurden lysiert. Über eine Inkubation mit anti-BSA-Agarose sollten die im Lysat vorhandenen, kovalent über Amid-Bindungen verbundenen Te-BSA-mAR-Rezeptor-Komplexe angereichert werden. Die so isolierten Proteine wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Zur Kontrolle wurden parallel drei Negativkontrollen durchgeführt, in denen im Reaktionsansatz entweder auf den Ligand oder die anti-BSA-Agarose oder auf beides verzichtet wurde.

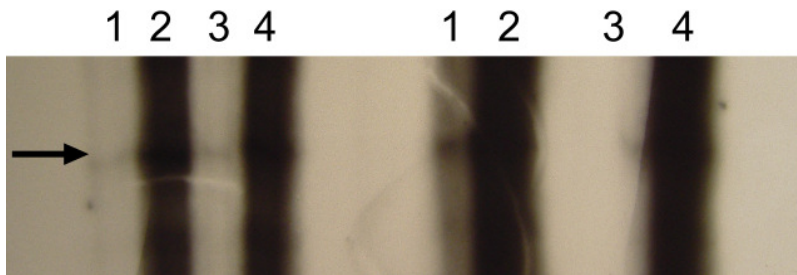


Abbildung 3.11:

Analyse der mittels Immunpräzipitation detektierten metabolisch markierten Proteine. Die Zellen wurden zunächst über Nacht radioaktiv markiert. Am nächsten Tag wurden die ersten vier Proben für 1 h auf Eis, die anderen vier Proben für 30 min bei 37 °C mit einem Te-BSA-Konjugat inkubiert. Mit Hilfe eines 'Crosslinkers' wurde diese Bindung anschließend kovalent fixiert, die Zellen lysiert, das Lysat mit anti-BSA-Agarose inkubiert und die angereicherten Proteine anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt. Die mit (1) markierten Spuren zeigen mit Te-BSA und anti-BSA-Agarose behandelte Proben, die mit (2) bzw. (3) bezeichneten Spuren zeigen Kontrollen, die mit Te-BSA aber ohne anti-BSA-Agarose bzw. ohne Te-BSA aber mit anti-BSA-Agarose behandelt wurden. Die mit (4) markierten Reaktionsansätze wurden weder mit Te-BSA noch mit anti-BSA-Agarose inkubiert.

Wie in *Abbildung 3.11* zu erkennen, konnte in allen Proben ein und dieselbe Bande nachgewiesen werden, was zeigt, dass kein spezifisch bindendes Protein aufgereinigt wurde.

3.7 Western-Blot-Analyse verschiedener Proteinfractionen

3.7.1 'Overlay' mit Te-BSA-FITC-Konjugat

Aus verschiedenen Makrophagenzelllinien (RAW-fos13/Guo *et al.*, 2002, RAW 264.7/ ECACC und RAW 264.7 TIB-71/ATCC) wurden zwei verschiedene Proteinfractionen isoliert. Dabei handelte es sich einmal um die lösliche Fraktion und die mit Hilfe verschiedener Detergenzien isolierten membranständigen Proteine. Die so gewonnenen Proteine wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und für eine Antikörperdetektion auf eine Nylonmembran transferiert.

Zur Detektion spezifisch Testosteron-bindender Proteine wurde die Membran zunächst mit einem Te-BSA-FITC-Liganden und anschließend mit einem an alkalische Phosphatase gekoppelten anti-FITC-Antikörper inkubiert. Bei der späteren Nachweisreaktion des AP-gekoppelten Antikörpers mit Hilfe des CSPD-Systems, konnte bei den 150 µg-Konzentrationen je eine schwache Bande detektiert werden.

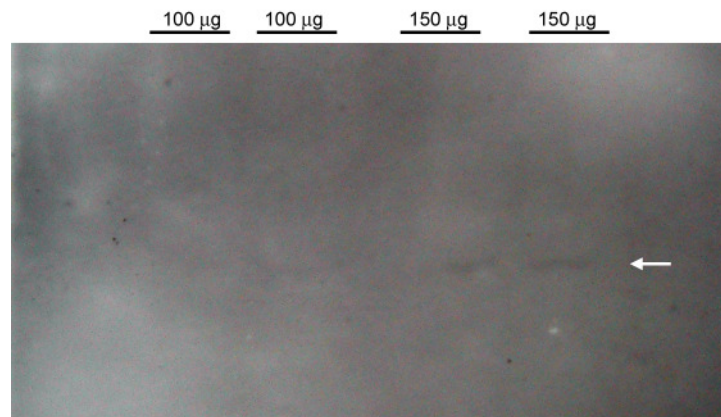


Abbildung 3.12:

Detektion spezifisch Testosteron-bindender Proteine mittels Te-BSA-FITC-‘Overlay’ nach Transfer auf Nylonmembran. Verschiedene Konzentrationen (100 und 150 µg) der aus RAW-fos13 (Guo *et al.*, 2002) und RAW 264.7 (ATCC) isolierten Membranfraktion wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und anschließend detektiert. Die gesetzte Markierung zeigt die Höhe der durch den starken ‘background’ im Bild schlecht zu erkennenden Banden.

Die Kombination von Nylonmembran und CSPD-System führte zu einer ausgeprägten ‘background’-Bildung; daher wurde der Versuch wiederholt. Statt auf Nylonmembran erfolgte der Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran. Außerdem wurde für die Detektion das sensitivere CDP-Star Reagenz eingesetzt.

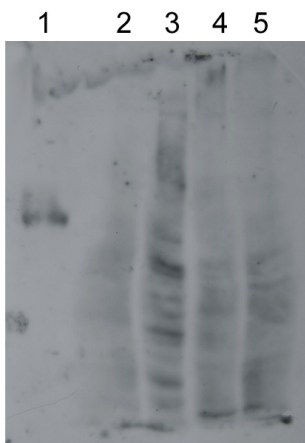


Abbildung 3.13:

Detektion spezifisch Testosteron-bindender Proteine mittels Te-BSA-FITC-‘Overlay’ nach Transfer auf Nitrocellulosemembran.

Um den unspezifischen ‘background’ zu reduzieren, wurden über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine statt auf Nylon- auf Nitrocellulosemembran transferiert. (1) BSA, (2) mit Triton X-100 isolierte Membranfraktion (MF), (3) mit NP-40 isolierte MF, (4) lösliche Proteinfraktion, (5) mit CHAPS isolierte MF.

Bei der anschließenden Nachweisreaktion wurden diesmal deutlich mehr Banden detektiert, was darauf schließen lässt, dass auch unspezifische Bindungen zwischen Ligand und Protein zustande kamen. Daher wurden Kontrollen durchgeführt, in denen entweder auf den Liganden oder auf den AP-gekoppelten Antikörper verzichtet wurde, aber in keiner dieser Reaktionen konnte ein Signal nachgewiesen werden. Das bewies, dass keine der beiden Komponenten schon von sich aus zu unspezifischen Signalen führte, der Ligand aber unspezifisch an Proteine binden konnte. Um die unspezifischen Bindungen zu reduzieren, wurde die Salzkonzentration des verwendeten Puffers auf bis zu 0,5 M Natriumchlorid erhöht, was aber nur eine marginale Verbesserung erkennen ließ.

Wie in *Abbildung 3.13* zu sehen, zeigten sich besonders in der mit NP-40 behandelten Membranfraktion deutliche Banden, weshalb im späteren Verlauf hauptsächlich mit diesem Detergenz gearbeitet wurde.

Da die RAW 264.7 Makrophagen, wie zuvor durch Expressionsstudien bewiesen, den klassischen Estradiolrezeptor exprimieren, wurde auch in diesem Ansatz versucht, die Detektion dieses Rezeptors mit Hilfe eines

Estradiol-Konjugats (E_2 -BSA-FITC) als Positivkontrolle zu verwenden.

Doch auch bei der Verwendung des E_2 -BSA-FITC-Konjugats kam es zu starken unspezifischen Bindungen.

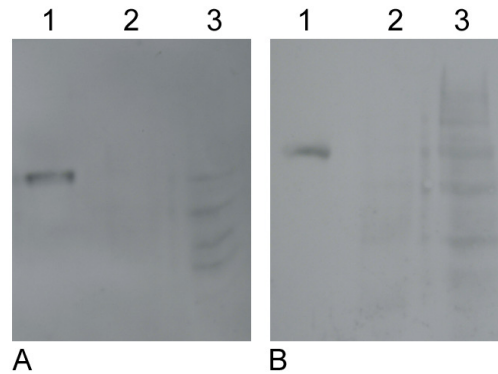


Abbildung 3.14: Vergleich zwischen 'Overlay' mit Te-BSA-FITC- (A) und E_2 -BSA-FITC-Konjugat (B). Aufgetragen wurden jeweils (1) BSA als Kontrolle, (2) mit NP-40 isolierte Membranfraktion und (3) lösliche Proteinfraction.

Um die Spezifität der Reaktionen zu erhöhen, wurde auf ein anderes Detektionsverfahren umgestellt.

3.7.2 'Overlay' mit Te-BSA-Konjugat

Die auf Nitrocellulose geblotteten Proteine wurden zunächst mit einem Te-BSA-Liganden, anschließend mit einem monoklonalen, gegen Testosteron-gerichteten Maus-Antikörper und zum Schluss mit einem 'Horseradish-Peroxidase' (HRP)-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper inkubiert. Spezifische Bindungen konnten mit Hilfe des ECL-Systems detektiert werden. Zunächst musste jedoch die Sensitivität des monoklonalen anti-Testosteron-Antikörpers bestimmt werden. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen (1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 500 fg) des Te-BSA-Liganden auf eine Membran pipettiert und mittels oben beschriebenen Verfahren detektiert. Dabei zeigte sich, dass bereits eine Konzentration von 100 pg an der unteren Detektionsgrenze des Systems liegt.

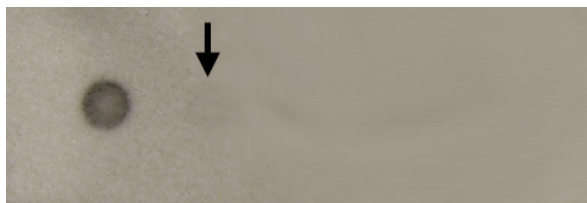
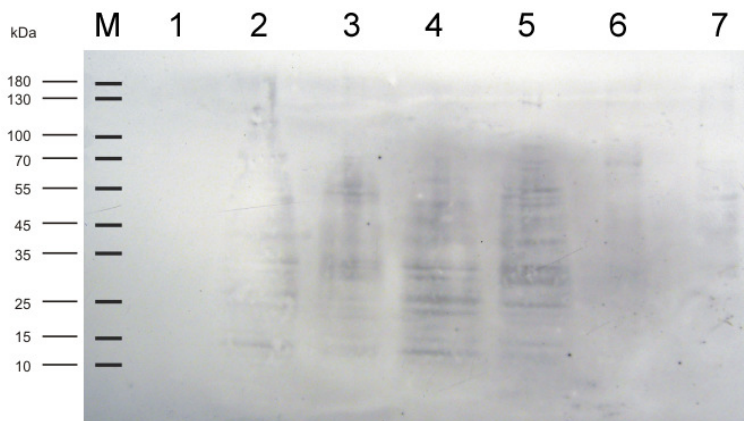


Abbildung 3.15: Mit Hilfe des monoklonalen anti-Testosteron-Antikörpers detektierte Te-BSA-Verdünnungsreihe. Eingesetzte Konzentrationen von links nach rechts: 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 500 fg. Die 1 ng-Konzentration ist deutlich zu erkennen, daneben, mit Pfeil markiert, auch noch ganz schwach die 100 pg-Konzentration.

Aufgrund der in diesem Vorversuch ermittelten geringen Sensitivität des Detektionssystems wurde für die weiteren Experimente eine sehr hohe Ligandenkonzentration (10 µg/ml) eingesetzt.

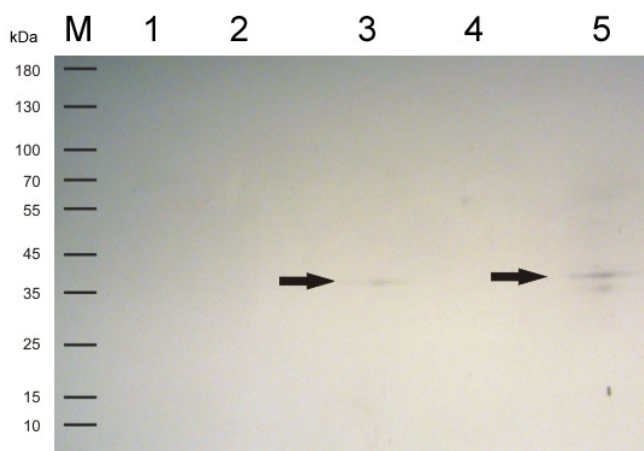
Abbildung 3.16:
Nach SDS-PAGE auf Nitrocellulose transferierte und anschließend mit Te-BSA-‘Overlay’ detektierte Proteine. Als Größenstandard (M) wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Auf das Gel aufgetragen und anschließend detektiert wurden die folgenden Proben (1) BSA, als Kontrolle, (2) RAW 264.7 Membranfraktion (MF), (3) RAW 264.7 lösliche Fraktion (LF), (4) RAW-fos13 MF, (5) RAW-fos13 LF, (6) Hoden BALB/c MF, (7) Hoden BALB/c LF.



Um eine unspezifische Bindung des monoklonalen anti-Testosteron-Antikörpers auszuschließen, wurde in einem Detektionsansatz auf die Zugabe des Liganden verzichtet, so dass unspezifische Signale auf die Bindung des monoklonalen Antikörpers zurück zu führen wären. Es konnten allerdings keinerlei Signale nachgewiesen werden.

Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, wurden weitere stringente Waschschritte sowohl nach der Liganden- als auch nach Antikörperinkubation in den Versuchsablauf eingefügt. Bei anschließenden Detektionen konnte eine einzelne Bande im Größenbereich von 35 kDa wiederholt reproduziert werden

Abbildung 3.17:
Nach SDS-PAGE auf Nitrocellulose transferierte und anschließend mit Te-BSA-‘Overlay’ detektierte Proteine. Während der Detektionsreaktion wurden zusätzliche stringente Waschschritte durchgeführt. Als Größenstandard (M) wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Auf das Gel aufgetragen und anschließend detektiert wurden folgende Proben: (1) BSA, als Kontrolle, (2) RAW 264.7 Membranfraktion (MF), (3) RAW 264.7 lösliche Fraktion (LF), (4) RAW-fos13 MF, (5) RAW-fos13 LF.



Um genaueren Aufschluss über das detektierte Protein zu bekommen, wurde die entsprechende Proteinfraction mittels hochauflösender 2D Gelelektrophorese analysiert.

3.8 Hochauflösende 2D Gelelektrophorese: Isoelektrische Fokussierung

Für die weitere Analyse wurden die Proteine der entsprechenden Fraction zunächst mit TCA gefällt und entsalzt. Die Proben wurden dann in gefällter Form an die Firma IBA GmbH, Göttingen geschickt. Dort wurden die Proteine aufgearbeitet, auf IEF-Streifen fokussiert und eingefroren.

Nach einer Inkubation in Äquilibriumspuffer konnte die Auftrennung über SDS-PAGE erfolgen. Im Anschluß wurden die Proteine mittels Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und nach dem bereits für die erste Dimension beschriebenen Verfahren detektiert.

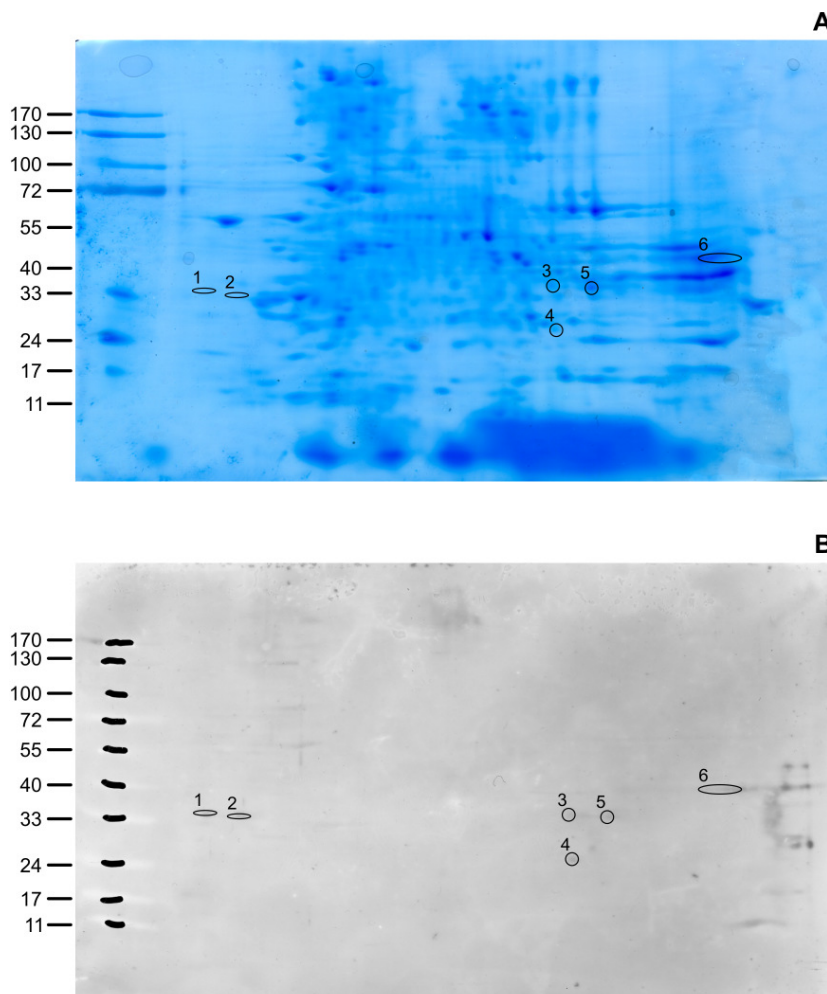


Abbildung 3.18: 2D-Gel und zugehöriger mittels Te-BSA-Overlay detektiertes Western-Blot der löslichen Proteinfraction aus RAW 264.7 Makrophagen. Als Marker beim Gellauf wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. (Einheit der Größenangabe des Proteinstandards: kDa). (A) zeigt das nach dem Western-Blot kolloidal-gefärbte SDS-Gel. Die mit 1 – 6 markierten Bereiche zeigen die ausgeschnittenen und massenspektrometrisch bestimmten Proteine, (B) zeigt die entsprechenden bei der Immundetektion nachgewiesenen positiven Signale.

In wiederholten Versuchsansätzen zeigte sich (siehe *Abbildung 3.18*), dass sechs potentielle Protein-Spots, in der mit der zuvor nachgewiesenen Bande übereinstimmenden Größenordnung, detektiert werden konnten. Diese potentiellen Kandidaten wurden aus dem Gel isoliert und massenspektrometrisch analysiert.

3.9 MALDI-TOF Analyse der isolierten Proteine und Abgleich mit Peptid-Datenbanken

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, das seit den 60er Jahren zur Analyse der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum eingesetzt wird. Bei dieser Technik wird der Dampf einer Probe mit Elektronen (70 eV) aus einem Heizdraht beschossen. Dabei brechen die Elektronen Bindungen auf und ionisieren die Probenmoleküle, die dadurch im magnetischen Feld abhängig von ihrer Masse und Ladung abgelenkt werden. Eine Analyse von Molekülen wie DNA oder Proteinen ist allerdings mit herkömmlichen Massenspektrometern nicht möglich, da diese aufgrund ihrer Größe und Ladung nicht flüchtig sind. Zudem würden sie unter dem hochenergetischen Elektronenbombardement zerfallen. Für die Analyse dieser Biomoleküle eignet sich daher die sogenannte **Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation (MALDI)**, bei der intakte Peptide bzw. Proteine in die Gasphase springen. Dafür werden die Proteine in UV-absorbierende Kristalle eingebaut. Diese Kristalle werden dann im Hochvakuum des Geräts mit einem UV-Laserimpuls bestrahlt, was zur Freisetzung der UV-absorbierenden Moleküle, ebenso wie der eingebauten Proteine führt. Gleichzeitig übertragen die sauren UV-absorbierenden Moleküle Protonen auf die Proteine, was zu einem positiven Ladungszustand führt. Ein Molekül mit den Fähigkeiten der UV-Absorption, der Cokristallbildung, sowie des Protonentransfers bezeichnet man als Matrix. Die protonierten Proteine gehen ohne Hydratwasser und Gegenionen Na^+ bzw. Cl^- in die Gasphase. Durch ein elektrisches Feld werden sie auf einen Schlitz hin beschleunigt, durch welchen sie in eine feldfreie Flugröhre gelangen. Da alle Ionen durch das gleiche Feld beschleunigt werden, ist die resultierende Geschwindigkeit proportional zu eins durch die Wurzel aus Masse und Ladung. Bei konstanter Wegstrecke erreichen die

verschiedenen Proteinionen zu verschiedenen Zeiten den Detektor, weshalb die Analysevorrichtung als Flugzeitanalysator ('time of flight' TOF) bezeichnet wird. Die Genauigkeit der Massenbestimmung liegt zwischen 0,1 und 0,001 Promille (Chait und Kent, 1992).

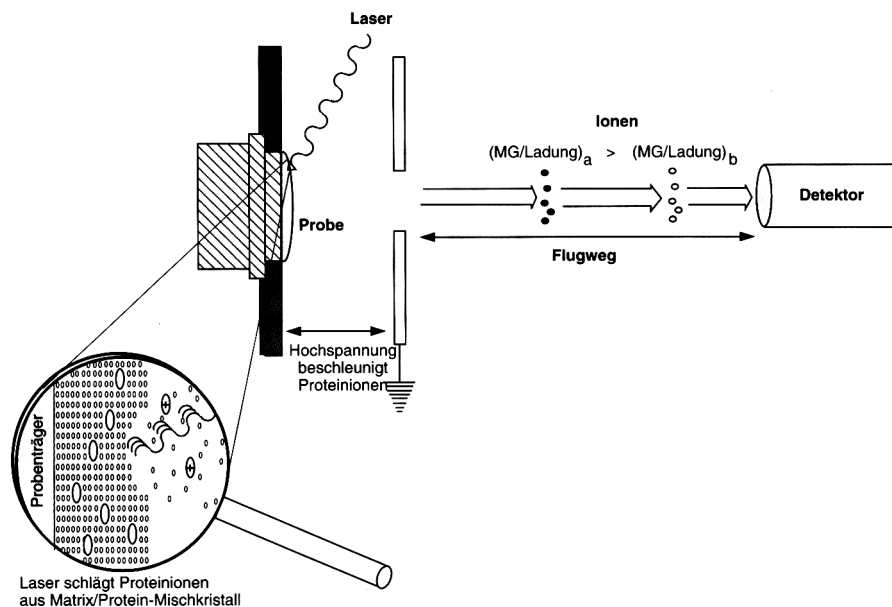


Abbildung 3.19:
Schematische Darstellung der
Matrix-unterstützten Laser-
Desorption Ionisation

Mit Hilfe des MALDI-TOF-Verfahrens sollten die sechs aus dem 2D-SDS-Gel isolierten Proteinproben analysiert werden. Dafür wurden die Proteine zunächst mit einer Protease (Trypsin) verdaut, was zur Bildung definierter Spaltfragmente führte. Die molekularen Massen dieser Spaltfragmente wurden bestimmt, was als Ergebnis den sogenannten 'Fingerabdruck' der unbekannt Proteine lieferte. Es erfolgte ein Datenbankabgleich, mit dessen Hilfe die Proteine eindeutig identifiziert werden konnten. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 3.2* dargestellt.

Tabelle 3.2:
Analyse der detektierten Proteine. Nach tryptischem Verdau und Entsalzung über ZipTipC18 wurden die in der Tabelle wiedergegebenen Peptide massenspektrometrisch sequenziert und durch Vergleich mit der Mascot-Datenbank identifiziert.

	Peptidmasse/Ladung	Aminosäuresequenz	Protein		
Spot 2	457,34++	LVIITAGAR	L-Laktatdehydrogenase-A		
	528,85++	DQLIVNLLK			
	559,85++	SADTLWGIQK			
	572,86++	VTLTPPEEAR			
	625,90++	QVDSAYEVIK			
Spot 3	508,34++	LVLVGDGGTGK	GTP-bindendes Protein Ran		
	607,87++	NLQYYDISAK			
	622,38++ (667,33++)AQGEPQVQFK			
	590,36++	YEELQITAGR			
Spot 4	590,36++	YEELQITAGR	Keratin, Cytoskelett		
	Spot 3	457,34++		LVIITAGAR	L-Laktatdehydrogenase-A
		528,45++		DQLIVNLLK	
		572,86++		VTLTPPEEAR	
		579,43++		VTLTPPEEAR + Methylester	
		625,95++		QVDSAYEVIK	
631,96++ (596,29++)	VIGSGCNLDSAR (Acrylocystein)				
Spot 4	508,34++	LVLVGDGGTGK	GTP-bindendes Protein Ran		
	595,64++	SNYNFEKPFLLWLAR			
	607,87++	NLQYYDISAK			
	622,91++ (667,33++)AQGEPQVQFK			
Spot 5	367,76++	NVNIFK	L-Laktatdehydrogenase-A		
	371,35++	LNLVQR			
	457,35++	LVIITAGAR			
	472,34++	FIIPNIVK			
	528,46++	DQLIVNLLK			
	572,86++	VTLTPPEEAR			
	625,90++	QVDSAYEVIK			
	631,89++ (596,29++)	VIGSGCNLDSAR (Arylocystein)			
	756,06++DQLIVNLLK			
Spot 6	382,29++	VLAAYYK	Aldolase A		
	470,79++	ELSDIAHR			
	573,85++ (538,28++)	ALANSLACQGK (Acrylocystein)			
	666,89++	GILAADESTGSIK			
	671,92++	ADDGRPFQVIK			
826,98++	FSNEEIAMATVTALR				

Leucin (L) und Isoleucin (I) können aufgrund ihrer nahezu gleichen Massen bei der Massenspektrometrie nicht unterschieden werden. Auch eine eindeutige Zuordnung von Lysin (K) und Glutamin (Q) ist aufgrund ihrer ähnlichen Massen nicht möglich.

Aus Spot 1 konnten außer Trypsinpeptiden keine weiteren Peptide isoliert werden.

Die folgenden Abbildungen (*Abbildung 3.20*) zeigen Beispielspektren für jedes der drei identifizierten Proteine.

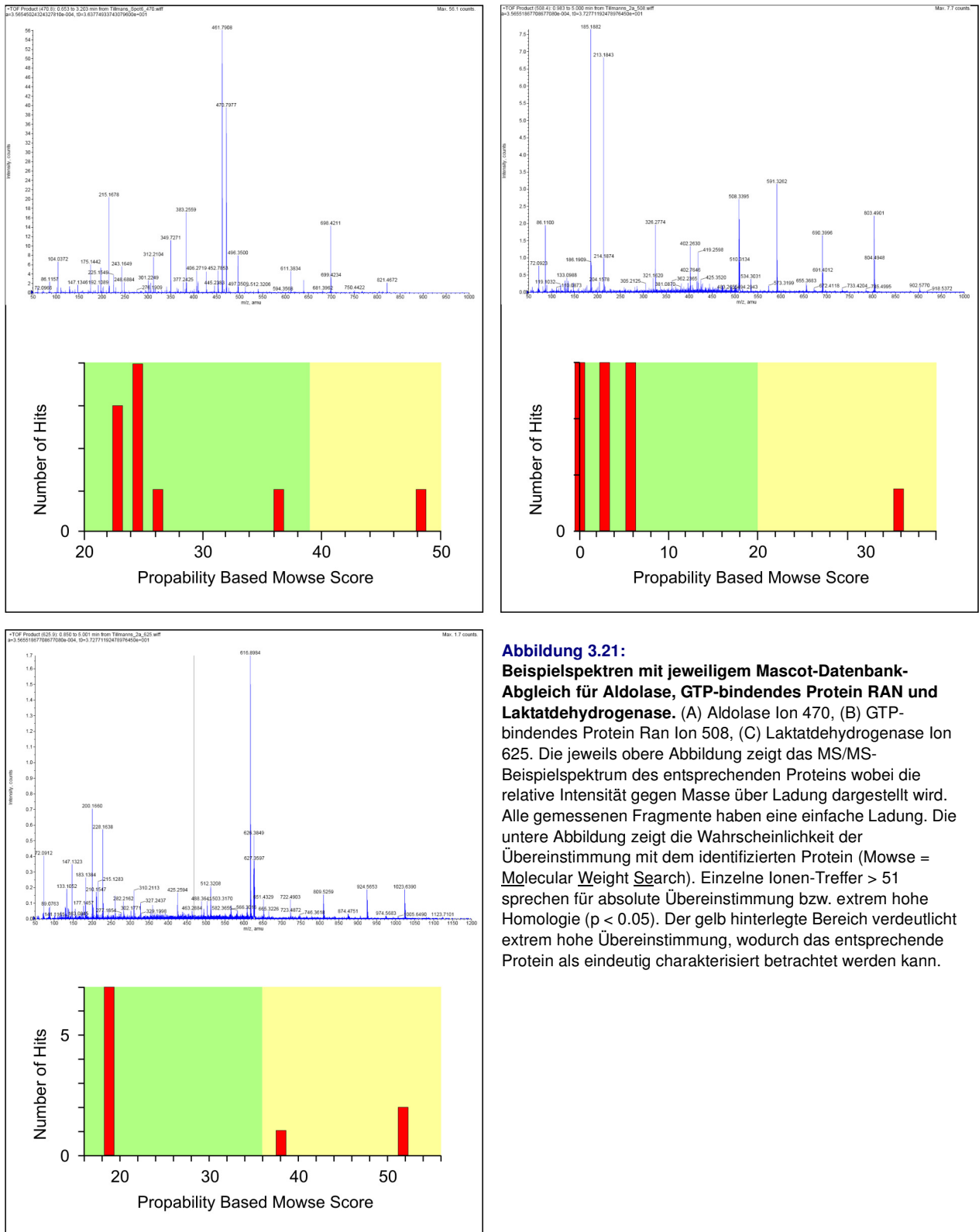


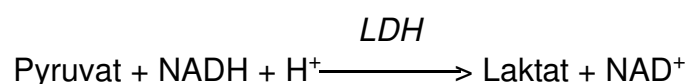
Abbildung 3.21: Beispielspektren mit jeweiligem Mascot-Datenbank-Abgleich für Aldolase, GTP-bindendes Protein RAN und Laktatdehydrogenase. (A) Aldolase Ion 470, (B) GTP-bindendes Protein Ran Ion 508, (C) Laktatdehydrogenase Ion 625. Die jeweils obere Abbildung zeigt das MS/MS-Spektrogramm des entsprechenden Proteins wobei die relative Intensität gegen Masse über Ladung dargestellt wird. Alle gemessenen Fragmente haben eine einfache Ladung. Die untere Abbildung zeigt die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung mit dem identifizierten Protein (Mowse = Molecular Weight Search). Einzelne Ionen-Treffer > 51 sprechen für absolute Übereinstimmung bzw. extrem hohe Homologie ($p < 0.05$). Der gelb hinterlegte Bereich verdeutlicht extrem hohe Übereinstimmung, wodurch das entsprechende Protein als eindeutig charakterisiert betrachtet werden kann.

Der Grund für eine Mehrfachdetektion desselben Proteins in verschiedenen pH-Bereichen ist auf unterschiedliche Phosphorylierungszustände zurückzuführen (Bsp. Laktatdehydrogenase-A und GTP-bindendes Protein Ran). In Spot 2 konnten drei Proteine detektiert werden, was vermuten lässt, dass entweder bei der Isolation der Probe aus dem Gel die Peripherie anderer Proteine versehentlich mit ausgeschnitten wurde, oder sich die Signale verschiedener Proteine mit gleichem oder ähnlichem isoelektrischen Punkt und Masse überlagert haben.

3.10 Funktionelle Analyse verschiedener Steroidkonzentrationen auf die Laktatdehydrogenase-Aktivität *in vitro*

Wie in *Abbildung 3.22* zu erkennen, konnte das Enzym Laktatdehydrogenase in drei der sechs massenspektrometrisch analysierten Proteinproben nachgewiesen werden, was für eine spezifische Bindung des Liganden spricht. Aus diesem Grund sollte der Einfluss verschiedener Testosteronkonzentrationen auf die Aktivität des Enzyms *in vitro* durch die Aufnahme einer Kinetik photometrisch bestimmt werden.

Die Reaktion erfolgte nach folgendem Schema:



Vor der Zugabe des Pyruvats wurde jeweils ein zweiminütiger Vorlauf registriert und die anschließende Reaktion für fünf Minuten bei einer Wellenlänge von 339 nm aufgenommen. Die Zugabe der verschiedenen Testosteronkonzentrationen (10^{-8} – 10^{-6} M) erfolgte parallel zur Zugabe des Substrats. Um sicherzustellen, dass eventuell messbare Effekte weder auf das Lösungsmittel zurückzuführen waren noch ausschließlich durch das Steroidgerüst hervorgerufen wurden, wurden ebenfalls Kontrollansätze mit Ethanol (1 % Endkonzentration) sowie Estradiol (10^{-9} – 10^{-6} M) gemessen. Die unterschiedlichen Startkonzentrationen der beiden Steroide (Testosteron 10^{-8} , Estradiol 10^{-9}) wurden aufgrund ihrer physiologischen Konzentrationen gewählt.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität [U]} = \frac{1}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{dE}{dt}$$

V: Küvettenvolumen (μl)

v: Probenvolumen (μl)

d: Schichtdicke (1 cm)

ϵ : 6,31 l · mmol⁻¹ · cm⁻¹ millimolarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 339 nm

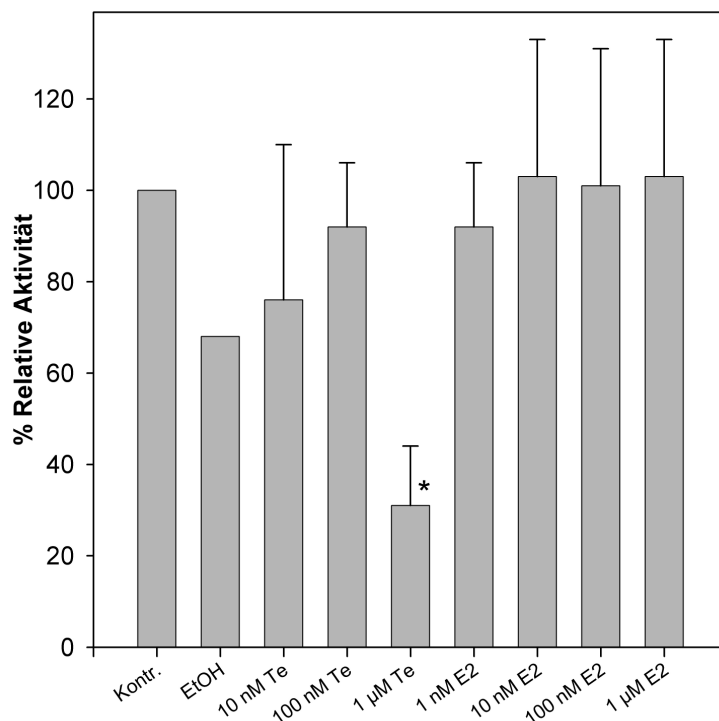


Abbildung 3.22: Darstellung der relativen Aktivität der Laktatdehydrogenase in Prozent. Getestet wurde der Einfluss von verschiedenen Testosteron- (10^{-8} – 10^{-6} M) sowie Estradiol- (10^{-9} – 10^{-6} M) Konzentrationen auf die Aktivität des Enzyms. Als Kontrolle diente die Zugabe von Ethanol (1 % Endkonzentration). Mit Stern gekennzeichnet ist ein signifikanter Testosteron-Effekt bei einer Konzentration von 10^{-6} M ($p < 0,05$, Unterschied zur EtOH-Kontrolle). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Student's t Test ermittelt.

Die Werte wurden normalisiert und es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen aufgetragen.

Es zeigt sich, dass im verwendeten Messsystem Testosteron in einer Konzentration von 10^{-6} M einen signifikanten Effekt auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) hat. Da bei Estradiol in keiner der getesteten Konzentrationen ein Effekt detektierbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass der signifikante Testosteron-Effekt nicht auf das Steroidgerüst allein zurückzuführen ist.

4.0 Diskussion

Steroidhormone haben eine Wirkung auf ein breitgefächertes Feld von zellulären Funktionen, wie z.B. Zellhomöostase, Proliferation, Differenzierung oder Apoptose. Wie Forschungsberichte der letzten Jahre zeigen, werden diese Regulationsmechanismen durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen genomischen, das heißt über eine direkte Kontrolle der Gen-Expression und sogenannten nicht-genomischen Effekten verursacht. Unter nicht-genomischen Effekten versteht man schnelle Steroidantworten, die innerhalb von Millisekunden bis Minuten auftreten (Watson und Lange, 2005) und ihre Wirkung über einen Einfluss auf die verschiedensten Signalkaskaden entfalten.

Bereits vor fast dreißig Jahren wurde von Richard Pietras und Clara Szego postuliert, dass eine membrangebundene Form des Estrogenrezeptors mit der schnellen Aktivierung intrazellulärer Signalwege zusammenhängt (Pietras und Szego, 1975, 1977). Seit dieser Zeit sind immer mehr unterschiedliche Regulationsmechanismen der nicht-genomischen Effekte entdeckt worden. Ihnen allen gemeinsam ist jedoch, dass der Ursprung ihrer Wirkung an der Plasmamembran initiiert wird. Die zentrale Debatte dreht sich daher um die Beantwortung der Frage, welche Klasse oder Klassen von Proteinen diese Membran-initiierten Effekte verursachen. Die bisher veröffentlichte Fülle an unterschiedlichen Daten scheint auf eine Beteiligung von mehr als einer Klasse von Steroid-bindenden Proteinen hinzuweisen (Watson und Gametchu, 2003).

4.1 Expressionsanalysen, Konstruktion und 'Screening' einer Lambda-Phagenbank

Im Zuge der Doktorarbeit wurde versucht, den von Benten *et al.* (1997, 1999a, 1999b) in RAW 264.7 Makrophagen detektierten membranständigen Androgenrezeptor zu isolieren, bzw. den Ursprung der nicht-genomischen Effekte in dieser Zelllinie zu analysieren.

Eine einfache und weit verbreitete Methode zur Isolierung spezifisch bindender Proteine bietet die Konstruktion und anschließende Analyse einer cDNA-Phagenbank. In Länge und Sequenz völlig unterschiedliche

cDNA-Fragmente werden dabei in einen Vektor kloniert und anschließend in Phagen verpackt. Mit den konstruierten Phagen werden dann Wirtszellen infiziert und diese ausplattiert. Über spezifische Nachweisverfahren ist es möglich, positive Klone zu detektieren und anzureichern. Bevor jedoch mit der Konstruktion einer λ -Phagenbank aus Poly(A⁺)-RNA der zu analysierenden murinen RAW 264.7 Makrophagen begonnen werden konnte, wurde zunächst die Expression des mAR über Bindung eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Te-BSA-FITC-Konjugats mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie bzw. die fehlende Expression des klassischen Androgenrezeptors (iAR) mittels RT-PCR in den zu analysierenden Zellen sichergestellt. Um eine möglichst repräsentative Bank herzustellen, ist es essentiell, auch gering exprimierte Proteine zu erfassen. mRNA-Transkripte von Eukaryonten können in drei Häufigkeitsklassen unterteilt werden. Zur Klasse I, mit mehr als 3.500 Kopien pro Zelle, werden etwa 30 verschiedene mRNA-Spezies gezählt. Klasse II (20 – 3.500 Kopien pro Zelle) umfasst etwa 1.000 und Klasse III (weniger als 20 Kopien pro Zelle) etwa 10.000 verschiedene mRNA-Spezies (Winnacker, 1990). Entsprechend hängt das repräsentative Auftreten einer bestimmten mRNA in der cDNA-Bibliothek mit seiner allgemeinen Kopienzahl im jeweiligen Zelltyp zusammen. Besonders kritisch ist in dem Zusammenhang, wenn das gesuchte spezifisch-bindende Protein von einer mRNA codiert wird, die nur mit 1 – 10 Kopien je Zelle vorliegt (Hastie und Bishop, 1976). Die erforderliche Anzahl der Klone N für eine mit der Wahrscheinlichkeit P repräsentative cDNA lässt sich nach folgender Formel berechnen. Dabei stellt 1/n die relative Häufigkeit einer seltenen beliebigen mRNA-Spezies dar (Clarke und Carbon, 1976):

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - 1/n)}$$

N: erforderliche Anzahl an Klonen für eine repräsentative cDNA-Bibliothek

P: Klonierungswahrscheinlichkeit

1/n: relativer Anteil einer seltenen beliebigen mRNA in Bezug auf die Gesamt-RNA

Aus einer Anzahl von 10^7 Zellen lassen sich zwischen 3 und 5 μg mRNA isolieren, was einer Menge von 4×10^{-8} μg pro Einzelzelle entspricht. Die Stoffmenge von 1 μg einer 100 Basen-RNA beträgt 29,4 pmol. Wenn

man davon ausgeht, dass 2 kb der Größe einer durchschnittlichen mRNA entspricht, bedeutet das für 1 µg dieser mRNA eine Stoffmenge von 2,47 pmol. Für 4×10^{-8} µg mRNA mit einer Größe von 2 kb pro Zelle ergibt sich daraus eine Stoffmenge von $5,8 \times 10^{-8}$ pmol. Die Menge der mRNA-Moleküle in einer Einzelzelle lässt sich nun durch Multiplikation mit der Avogadro-Konstanten berechnen; nach dieser Rechnung $3,5 \times 10^4$. Nimmt man an, dass unterrepräsentierte Spezies in einfacher Kopienzahl in der Zelle vorliegen, so entspricht $n = 3,5 \times 10^4$. Die relative Häufigkeit $1/n$ liegt dann bei $2,9 \times 10^{-5}$ und daher berechnet sich bei einer Klonierungswahrscheinlichkeit von 99 % der Umfang einer repräsentativen cDNA-Bibliothek mit $1,6 \times 10^5$ Klonen.

Mit Hilfe des 'SMART™ cDNA Library Construction Kits' ist es durch die Vereinigung verschiedener Ligations- und Verpackungsansätze gelungen, eine Primärbank mit ca. $4,6 \times 10^6$ unabhängigen Einzelklonen herzustellen. Damit liegt der Umfang der konstruierten und analysierten Bank fast 30fach über der berechneten Repräsentativitätsgrenze. Die Detektion Testosteron-spezifischer Klone erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenz-Systems CSPD. In der Nachweisreaktion wird durch die an einen Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase das Substrat CSPD umgesetzt. So entsteht ein metastabiles Zwischenprodukt, das sich spontan unter Lichtemission umlagert (Vant Erve *et al.*, 1993). Die Chemilumineszenzentwicklung ist für mindestens 50 min konstant (Yang *et al.*, 1997) und kann über einen entsprechend sensitiven Film detektiert werden. Durch das Auftreten starker unspezifischer Signale, die auch durch Änderungen an der Versuchsdurchführung nicht eliminiert werden konnten, gestaltete sich die Analyse der Phagenbibliothek schwierig. Nach mehreren 'Screening'-Runden konnte kein spezifisch Testosteron-bindender Klon identifiziert und isoliert werden.

Wenn man davon ausgeht, dass das gesuchte Bindeprotein von einer seltenen mRNA-Spezies codiert wird, so ergibt sich für die analysierte Primärbank eine Wahrscheinlichkeit von fast 1, dass ein entsprechender Klon in der Bibliothek vertreten war. Da trotz dieser fast 100%igen Wahrscheinlichkeit kein positiver Klon isoliert werden konnte, ist davon auszugehen, dass das verwendete Versuchssystem nicht sensitiv genug war, da es keine Möglichkeit bot, spezifische von unspezifischen Signalen zu unterscheiden. Die Sensitivität des Detektionssystems

wurde zwar vor dem eigentlichen 'Screening' der Primärbank getestet, jedoch kann keine Aussage zur Stabilität der Bindung zwischen dem Liganden (Te-BSA-FITC-Konjugat) und einem entsprechend spezifisch bindenden Protein unter den gegebenen Bedingungen gemacht werden. Es wäre also möglich, dass spezifische Bindungen während der langwierigen Detektionsreaktion mit vielen stringenten Waschschritten zerstört wurden und daher kein positives Signal nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu verursachten möglicherweise auch verschiedene Wechselwirkungen (wie beispielsweise Hydrophobizität) die Bindung des Liganden an nicht-Testosteron-bindende Elemente oder die Membran und führten zur Darstellung starker unspezifischer Signale, die so die eigentlich positiven Signale überlagerten.

4.2 Aufreinigung von Te-BSA-FITC-mAR-Komplex enthaltenden Vesikeln mittels MACS

In verschiedenen Zelllinien, bei denen mittels Fluoreszenz über Antikörper- oder Ligandenbindung membranständige Rezeptoren detektiert werden konnten, traten diese asymmetrisch auf der Oberfläche angeordnet als mobile, punktförmige, unterschiedlich große 'cluster' auf (Gametchu, 1987, Pappas *et al.*, 1994, Sackey *et al.*, 1997, Norfleet *et al.*, 1999, Campbell *et al.*, 2002, Dan *et al.*, 2003). Auch bei den murinen Makrophagen RAW 264.7 konnten mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Testosteron-BSA-Liganden eindeutig spezifische, assymetrisch angeordnete Bindungsstellen auf der Zelloberfläche detektiert werden (Benten *et al.*, 1997, 1999a, 1999b). Diese als membranständiger Androgenrezeptor (mAR) bezeichnete Bindungsstelle wird nach spezifischer Ligandenbindung zunehmend internalisiert (Guo *et al.*, 2002b). Ein solcher Mechanismus konnte auch für den in allen Experimenten verwendeten Zellklon RAW 264.7 TIB-71 (ATCC) über eine Bindungsstudie nachgewiesen werden. Dafür wurden Zellen unterschiedlich lange mit einem Te-BSA-FITC-Konjugat inkubiert und anschließend am Konfokalen Laserscanning Mikroskop analysiert. Nach einer einminütigen Inkubation war die Fluoreszenz ausschließlich an der Zelloberfläche zu erkennen. Bereits nach fünf Minuten zeigte sich allerdings schon eine zunehmende Internalisierung des Komplexes und

nach weiteren 10 min waren deutlich kleine fluoreszierende Vesikel im Cytoplasma der Zellen detektierbar. Diese den Ligand-mAR-Komplex enthaltenden Vesikel sollten mit Hilfe des MACS-Systems (Magnetic Cell Sorting System) für eine spätere Analyse über SDS-PAGE angereichert werden. Dafür wurde zunächst der Te-BSA-FITC-Ligand mit magnetischen anti-FITC-Microbeads komplexiert. Dieser Komplex wurde dann während einer entsprechenden Inkubation von den Makrophagen internalisiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Microbead-Ligand-mAR-Komplex enthaltenden Vesikel über eine Säule im Magnetfeld aufgereinigt. Bei der anschließenden Analyse dieser Fraktion über SDS-PAGE zeigte sich, dass keine Anreicherung stattgefunden hatte. Das MACS-System wurde ursprünglich dazu entwickelt, spezifische Merkmale auf der Oberfläche von Zellen mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten Microbeads zu markieren und diese entsprechend im magnetischen Feld als Selektionsmarker zu verwenden. Im durchgeführten Versuch lagen die magnetischen Partikel in den zu isolierenden Vesikeln vor, das heißt sie waren von einer Plasmamembran umschlossen. Daher ist es möglich, dass die magnetische Kraft so stark abgeschirmt wurde, dass es nicht möglich war, eine Anreicherung zu erreichen. Durch die Abschwächung der Magnetkraft ist es auch möglich, dass eventuell spezifisch gebundene Vesikel bei einem der durchgeführten Waschschriffe wieder ab gespült wurden. Nach Rücksprache mit der Herstellerfirma ist auch eine enzymatische Zersetzung der verwendeten Microbeads im Innern der Vesikel denkbar, was jegliche Anreicherung im Magnetfeld unmöglich machen würde.

4.3 Immunpräzipitation metabolisch markierter Proteine

Eine weitere hier durchgeführte Methode zur Isolation des membranständigen Androgenrezeptors war die Immunpräzipitation. Um ein möglichst sensitives Detektionsverfahren zu haben, und entsprechend auch geringe Mengen spezifisch bindendes Protein nachweisen bzw. isolieren zu können, wurden RAW 264.7 Makrophagen zunächst metabolisch markiert. Dafür wurden die Zellen über Nacht mit radioaktiv markiertem Methionin/Cystein inkubiert. Am nächsten Tag

folgte eine Behandlung mit dem Liganden (Te-BSA-Konjugat), der spezifisch an den membranständigen Androgenrezeptor binden sollte. Um die Bindung zwischen Ligand und dem mAR zu stabilisieren, wurde anschließend mit einem 'Crosslinker' (DSP) gearbeitet. DSP reagiert mit primären Aminen und verursacht eine kovalente Amid-Bindung. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das resultierende Lysat mit anti-BSA-Agarosebeads inkubiert. Über eine Bindung des BSA-Trägers des Liganden an die anti-BSA-beads sollte der Ligand-mAR-Komplex angereichert und über Waschschrte aufgereinigt werden. Die komplette Fraktion inklusive anti-BSA-Agarosebeads wurde denaturiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Dabei zeigte sich, dass keine spezifische Bande nachzuweisen war. In allen Spuren (sowohl den Kontrollen als auch der eigentlichen Probe) war jedoch jeweils eine Bande auf gleicher Höhe detektierbar. Diese wurde wahrscheinlich durch unspezifische Bindung des Liganden hervorgerufen. Da die Größe des putativen membranständigen Androgenrezeptors nicht bekannt ist, wäre es möglich, dass eine spezifische Bande einfach überlagert wurde.

4.4 Detektion und Analyse spezifisch-Testosteron bindender Proteine

Im Jahr 2003 gelang es Zhu *et al.* einen membranständigen Progesteronrezeptor (mPR) zu charakterisieren. Dieser Rezeptor besitzt sieben Transmembran-Domänen und gehört damit zur heptahelikalen Rezeptorfamilie. Mit Hilfe seiner Sequenz gelang es, eine neue Familie mPR-verwandter Proteine aus unterschiedlichen Spezies zu identifizieren. Neben der Konstruktion und Analyse einer cDNA-Bibliothek wurden auch direkte 'Screenings' der aus den Oozyten der gepunkteten Meerforelle gewonnenen Proteine durchgeführt. Die erfolgreiche Aufreinigung des mPR gelang über eine spezifische Interaktion zwischen einem der isolierten Proteine und einem monoklonalen Antikörper. Mit Hilfe dieser Methodik konnte das 40 kDa große Protein detektiert und anschließend als mPR identifiziert werden (Zhu *et al.*, 2003a, 2003b).

In Anlehnung an die Versuchsdurchführung dieser Arbeitsgruppe wurden lösliche und membranständige Proteine in zwei verschiedenen

Fraktionen aus RAW 264.7 Makrophagen isoliert und über 'Overlay' mit Te-BSA-FITC- bzw. Te-BSA-Konjugat analysiert. Dabei ließ sich in der Probe mit den löslichen Proteinen wiederholt ein spezifisch bindendes etwa 35 kDa großes Protein detektieren. Geht man davon aus, dass es sich beim putativen mAR, wie im Fall des charakterisierten mPR, um einen Rezeptor mit sieben Transmembran-Domänen handelt, würde man eine spezifische Bindung eher in der Membranfraktion erwarten. Dass dennoch eine spezifische Bindung in der löslichen Fraktion nachzuweisen war, lässt sich möglicherweise damit erklären, dass sich das Protein unter den gegebenen Versuchsbedingungen teilweise von der Membran gelöst hat. Da bekannt ist, dass nicht-genomische Effekte nicht nur über membranständige heptahelikale Transmembranrezeptoren, sondern unter anderem auch über Enzyme, Ionenkanäle, klassische Steroidrezeptoren an nicht-klassischen Positionen oder Transporter-Proteine hervorgerufen werden können (Watson und Gametchu, 2003), ist es ebenfalls möglich, dass es sich im Falle des von Benten *et al.* (1997, 1999a, 1999b) beschriebenen membranständigen Rezeptors nicht um ein integrales Membranprotein handelt. Manche über Ionenbindungen mit der Membran assoziierten Proteine lassen sich bereits leicht durch hydrophobe Wechselwirkung lösen.

Um das detektierte Protein näher charakterisieren zu können, wurde die entsprechende Fraktion mittels isoelektrischer Fokussierung und anschließender massenspektrometrischer Analyse der potentiellen Kandidaten weiter untersucht. Auf dem Film nach 'Overlay' des 2D-Blots konnten wiederholt sechs spezifische Signale im erwarteten Größenbereich detektiert werden. Die entsprechenden Proteinspots wurden zugeordnet und aus dem Gel ausgeschnitten. Die massenspektrometrische Bestimmung erfolgte im Analytischen Zentrallabor des Biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. Dabei konnten folgende Proteine eindeutig charakterisiert werden: Laktatdehydrogenase-A, GTP-bindendes Protein Ran und Aldolase. Laktatdehydrogenase und Aldolase sind klassische Stoffwechsellzyme, die an verschiedenen Energiegewinnungsprozessen der Zelle beteiligt sind. Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert die NAD^+ -abhängige Umwandlung von Laktat zu Pyruvat während der anaeroben Glykolyse.

Aldolase katalysiert die Reaktion von Fructose-1,6-bisphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat bei der Glykolyse. Das GTP-bindende Protein Ran kontrolliert den Translokationsvorgang von Substraten aus dem Cytoplasma in den Zellkern.

Wie bereits erwähnt, gibt es Forschungsberichte über die Beteiligung verschiedener Enzyme an der Vermittlung von nicht-genomischen Effekten (Watson und Gametchu, 2003). Besonders für die Enzyme der Glykolyse ist bereits bekannt, dass sie an vielen anderen komplexen zellulären Prozessen beteiligt sind (Kim und Dang, 2005). Außerdem weiß man, dass einige glykolytische Enzyme Membran-assoziiert sein können. So konnte zum Beispiel für Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), Fructose-bisphosphat Aldolase und Phosphofruktokinase eine Bindung an die Erythrocyten-Membran *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Kaul und Köhler, 1983, Macara und Cantley, 1983, Jenkins *et al.*, 1984), wobei die katalytische Aktivität von GAPDH und Aldolase durch diese Bindung inhibiert wird (Strapazon und Steck, 1977, Murthy *et al.*, 1981, Tsai *et al.*, 1982).

LDH ist ein Heterotetramer bestehend aus A- (hauptsächlich in Leber und Muskel zu finden) und B-Untereinheiten (Herz). LDH-A konnte bereits vor Jahren in verschiedenen Zelltypen als Einzelstrang-DNA (ssDNA)-bindendes Protein (Cattaneo *et al.*, 1985, Grosse *et al.*, 1986), ebenso wie als DNA-Helix-stabilisierendes Protein (Williams *et al.*, 1985) oder als ARE (AU-rich element) bindendes Protein mit Einfluss auf die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression (Pioli *et al.*, 2002) identifiziert werden. Neuere Studien scheinen zu bestätigen, dass LDH-A und LDH-B Komponenten eines Zellzyklus-abhängigen Co-Aktivators der Transkription sind (Zheng *et al.*, 2003). Immerhin für zwei der massenspektrometrisch bestimmten Proteine (LDH-A und Ran) konnten in der Literatur auch Hinweise auf ihr Zusammenwirken mit Steroidhormonen bzw. klassischen Steroidrezeptoren gefunden werden. So konnte gezeigt werden, dass in MCF-7 Zellen, einer humanen Brustkrebszelllinie, 17 β -Estradiol die LDH-A Promotoraktivität über einen nicht-genomischen Mechanismus reguliert (Li *et al.*, 2004). Für das GTP-bindende Protein Ran, in der Literatur unter anderem auch als ARA24 bezeichnet, konnte ein Einfluss auf die x-chromosomal vererbte spinale

und bulbäre Muskelatrophie (Kennedy's Disease) nachgewiesen werden. Diese Krankheit ist mit der Länge der N-terminalen Polyglutamin-Region des klassischen Androgenrezeptors assoziiert. Ran/ARA24 kann über eine Bindung an diese N-terminale Poly-Q-Region die Transaktivierung des klassischen Androgenrezeptors verstärken und so als Co-Aktivator wirken. Die Bindung von Ran/ARA24 führt zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber Androgenen (Hsiao *et al.*, 1999).

Im Jahr 2001 hat eine Arbeitsgruppe auf der Suche nach dem putativen membranständigen Estrogenrezeptor über verschiedene Bindungsstudien das ebenfalls an der Glykolyse beteiligte 37 kDa große Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) isoliert. Dafür wurden ebenfalls zwei aus Rattenhirn gewonnene Proteinfractionen (lösliche und membrangebundene Proteine) über mit Estradiol- bzw. Progesteron-BSA-Konjugat-Matrix enthaltende Säulen aufgereinigt. Dabei konnte GAPDH aus jeder Fraktion angereichert werden; die Affinität für eine Bindung mit Estradiol war allerdings deutlich höher als für eine Bindung mit Progesteron. Bei *in vitro* Aktivitätsstudien konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe von 10 nM Estradiol zu einem schnellen und signifikanten Anstieg von V_{max} und einer Änderung des K_M -Werts führt. Eine Dosis von 100 nM Progesteron führte nur zu einer signifikanten Abnahme von V_{max} . Testosteron, Corticosteroid, 17 α -Estradiol und Diethylstilbestrol führten zu keinerlei Beeinflussung der GAPDH-Enzymaktivität (Joe und Ramirez, 2001, Ramirez *et al.*, 2001).

Um zu überprüfen, ob Testosteron einen Einfluss auf die Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) *in vitro* hat, wurden verschiedene Konzentrationen getestet. Um sicher zu stellen, dass mögliche Effekte auf die Aktivität nicht nur ausschließlich auf das Steroidgerüst oder das Lösungsmittel zurückzuführen waren, wurden Kontrollen mit verschiedenen Estradiolkonzentrationen, ebenso wie mit Ethanol durchgeführt. In bisher durchgeführten Versuchen scheint sich ein signifikanter Einfluss von Testosteron (bei einer Konzentration von 1 μ M) auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase zu bestätigen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass LDH ein Angriffspunkt für dieses Steroidhormon ist und die Interaktion möglicherweise einen neuen, noch unbekanntem nicht-genomischen Signalweg darstellt. Weiterhin ist auch denkbar, dass die nicht-genomischen Effekte in den RAW 264.7 Makrophagen nicht

über die Bindung von Testosteron an einen klassischen heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, sondern über die Bindung an eine membrangebundene Subfraktion der Laktatdehydrogenase initiiert werden.

4.5 Ausblick

In den durchgeführten Arbeiten gelang es, über Bindungsexperimente spezifisch Testosteron-bindende Proteine anzureichern und massenspektrometrisch zu bestimmen. Dabei konnten die drei folgenden Kandidaten charakterisiert werden: Laktatdehydrogenase, GTP-bindendes Protein Ran und Aldolase. Für das Enzym Laktatdehydrogenase konnte in einem *in vitro* Ansatz gezeigt werden, dass Testosteron in einer Konzentration von 1 μM offensichtlich einen signifikant suprimierenden Einfluss auf die Enzymaktivität hat. Dies muss in weiteren Experimenten (*in vitro* und *in vivo*) nochmals überprüft und bestätigt werden. Auch andere Steroidhormone sollten auf ihre möglichen aktivierenden bzw. suprimierenden Einflüsse auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase getestet werden.

In vielen humanen Krebszellen lässt sich ein erhöhter Laktatdehydrogenase-Level nachweisen (Matrisian *et al.*, 1985, Short *et al.*, 1994, Huang *et al.*, 1995, Chung *et al.*, 1995, Shim *et al.*, 1997). Die Überexpression der Laktatdehydrogenase könnte also Krebszellen entweder durch ihre enzymatische Aktivität oder ihre genregulatorischen Wirkung einen neoplastischen Wachstumsvorteil bieten. Eine weitere Erforschung der verschiedenen Funktionen sowie einer Beteiligung dieses Enzyms an der möglichen Vermittlung von nicht-genomischen Effekten, könnte unter Umständen zu einem besseren Verständnis der Krebsentstehung führen und so möglicherweise auch zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden beitragen.

Weiterhin ist es wichtig, zu erkennen, dass offensichtlich so gut wie jedes Gewebe in irgendeiner Form (über klassische Rezeptoren und deren Co-Aktivatoren, nicht-genomische Effekte oder regulative Einflüsse auf Enzymaktivitäten) durch Steroidhormone beeinflusst wird. Diese komplexen zellulären Zusammenhänge zu entschlüsseln, wird helfen, viele wichtige medizinische Probleme zu klären und entsprechend neue

therapeutische Möglichkeiten zu offenbaren. So könnten bei der Behandlung bestimmter Krankheiten auftretende Nebenwirkungen, wie z.B. die Erhöhung des Prostatakrebsrisikos durch die Gabe von Testosteron bei koronaren Arterienerkrankungen (Jones *et al.*, 2004), oder die Erhöhung des Brust- oder Gebärmutterkrebsrisikos durch die Gabe von Estrogenen zur Behandlung von Osteoporose (Kousteni *et al.*, 2002) verhindert werden, indem man Medikamente entwickelt, die ihre Wirkung ausschließlich über den nicht-genomischen Weg entfalten.

5.0 Zusammenfassung

Das Steroidhormon Testosteron kann seine Wirkung über zwei verschiedene Mechanismen entfalten: Über die Aktivierung des genomischen Wegs durch den klassischen intrazellulären Androgenrezeptor oder durch schnelle, nicht-genomische Wirkung über einen noch nicht näher charakterisierten membranständigen Androgenrezeptor (mAR).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolation und Charakterisierung des membranständigen Androgenrezeptors bzw. die Identifizierung von spezifisch Testosteron-bindenden Proteinen, die für die Initiierung der nicht-genomischen Effekte in den RAW 264.7 Makrophagen verantwortlich sind.

In allen Experimenten wurde die murine Makrophagenzelllinie RAW 264.7 verwendet, die keinen klassischen Androgenrezeptor exprimiert, wie mittels RT-PCR nachgewiesen wurde. Trotz des fehlenden iAR konnten am Konfokalen Laserscanning Mikroskop (CLSM) nach Inkubation der Makrophagen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Testosteron-BSA-Konjugat (Te-BSA-FITC), spezifische Bindungsstellen auf der Zelloberfläche detektiert werden.

Zur Isolierung des mAR wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Als erstes wurde eine λ -Phagenbank mit $4,6 \times 10^6$ unabhängigen Klonen konstruiert, um Phagen zu isolieren, die ein spezifisch Testosteron-bindendes Protein exprimieren. Trotz der großen Zahl an Primärklonen konnte aus dieser Bank kein Phage isoliert werden, der reproduzierbar ein Te-BSA-FITC-bindendes Protein exprimiert hätte.

Zweitens wurde versucht, die bei der Internalisierung der Te-BSA-FITC-mAR-Komplexe entstehenden Vesikel mit Hilfe des MACS-Systems anzureichern und die darin befindlichen Proteine über SDS-PAGE zu analysieren. Dazu wurden zunächst Te-BSA-FITC und anti-FITC-Microbeads komplexiert und die RAW 264.7 Zellen nach erfolgreicher Internalisierung der Microbeads lysiert. Die Vesikel sollten dann im magnetischen Feld aufgereinigt werden. Durch die Internalisierung wurde jedoch unter Umständen die magnetische Kraft der verwendeten Beads soweit abgeschwächt, dass keine Fixierung an der Säulenmatrix erfolgte. Laut Hersteller ist es außerdem möglich, dass die Microbeads in den Vesikeln aufgrund der dort herrschenden enzymatischen Bedingungen zersetzt wurden.

Als drittes wurden Zellen mit radioaktivem Methionin/Cystein metabolisch markiert und mit Te-BSA-Konjugat inkubiert. Nach Bindung des Liganden an den mAR wurde die Bindung kovalent über einen 'Crosslinker' fixiert, die Zellen lysiert und mit anti-BSA-Agarose inkubiert. Die so angereicherten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Es zeigte sich jedoch, dass – egal unter welchen Bedingungen – stets zahlreiche verschiedene Proteine präzipitiert wurden.

Viertens erfolgte die Identifizierung Testosteron-bindender Proteine aus RAW 264.7 Zellen mittels 'Overlay'. Dabei konnte reproduzierbar eine etwa 35 kDa große Bande in der löslichen Proteinfraction nachgewiesen werden. Um die Identität dieses Proteins zu bestimmen, wurden eine 2D-Analyse und eine anschließende massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Dabei konnten die Enzyme Laktatdehydrogenase (LDH) und Aldolase sowie das GTP-bindende Protein Ran eindeutig identifiziert werden. Mittels eines *in vitro* Enzymtests wurde eine konzentrationsabhängige Suppression der LDH Aktivität durch Testosteron festgestellt. Eine solche direkte Testosteron-LDH Wechselwirkung legt die Möglichkeit nah, dass es sich beim mAR nicht um einen klassischen heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptor handelt, sondern dass eine Subfraktion der LDH auch an der Plasmamembran lokalisiert ist, hier Testosteron bindet und nicht-genomische Signalwege initiiert.

6.0 Literatur

Acconcia, F., Totta, O., Ogawa, S., Cardillo, I., Inoue, S., Leone, S., Trentalance, A., Muramatsu, M. and Marino, M. [2004]: Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: Role of ERalpha and ERbeta activated non-genomic signaling: *J. Cell Physiol.*

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. [1990]: Basic local alignment search tool: *J. Mol. Biol.* 215, 430-410

Altschul, S.F. and Lipman D.J. [1990]: Protein database searches for multiple alignments: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*: 87, 5509-5513

Aronica, S.M., Kraus, W.L. and Katzenellenbogen, B.S. [1994]: Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription: *PNAS*: 91, 8517-8521

Arriza, J.L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T.M., Handelin, B.L., Housmann, D.E. and Evans, R.M. [1987]: Cloning of human mineralo-corticoid receptor cDNA: structural and functional kindship with the glucocorticoid receptor: *Science*: 237, 268-275

Beato, M. [1989]: Gene regulation by steroid hormones: *Cell*: 56, 335-344

Beato, M. and Klug, J. [2000]: Steroid hormone receptor: an update: *Human Reproduction Update*: 6, 225-236

Benten, W.P.M., Bettenhäuser, U., Wunderlich, F., Van Vliet, E., and Mossmann, H. [1991]: Testosterone induced abrogation of self-healing of *p. chabaudi* malaria: mediation by spleen cells: *Infect. Immun.* 59, 4486-4490

Benten, W.P.M., Lieberherr, M., Sekeris, C.E., and Wunderlich, F. [1997]: Testosterone induces Ca^{2+} influx via non-genomic surface receptors in activated T cells: *FEBS Letters*: 407, 211-214

Benten, W.P.M., Lieberherr, M., Giese, G., Wunderlich, F. [1998]: Estradiol binding to cell surfaces raises cytosolic free calcium in T cells: *FEBS Lett.*: 422, 349-353

Benten, W.P.M., Lieberherr, M., Giese, G., Wrehlke, C., Stamm, O., Sekeris, C.E., Mossmann, H., and Wunderlich, F. [1999a]: Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells: *FASEB*: 13, 123-133

Benten, W.P.M., Lieberherr, M., Stamm, O., Wrehlke, C., Guo, Z., and Wunderlich, F. [1999b]: Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages: *Mol. Biol. Cell*: 10, 3113-3123

Birnboim, H.C. [1983]: A rapid alkaline method for isolation of plasmid DNA: *Methods Enzymol.*: 100, 243-255

Bjerrum, O.J., and Schafer-Nielsen, C. [1989]: Gel electrophoresis of protein. In: Dunn, M.J. (ed.), *Electrophoresis*, WCH, Weinheim: 315-327

Bonaccorsi, L., Muratori, M., Carloni, V., Marchiani, S., Formigli, L., Forti, G., and Baldi, E. [2004]: The androgen receptor associates with the epidermal growth factor receptor in androgen-sensitive prostate cancer cells: *Steroids*: 69, 549-552

Bonaccorsi, L., Muratori, M., Carloni, V., Zecchi, S., Formigli, L., Forti, G., and Baldi, E. [2003]: Androgen receptor and prostate cancer invasion: *Int. J. Androl.*: 26, 21-25

Bonaccorsi L., Carloni V., Muratori M., Salvadori A., Giannini A., Carini M., Serio M., Forti G., Baldi E. [2000]: Androgen receptor expression in prostate carcinoma cells suppresses alpha6beta4 integrin-mediated invasive phenotype: *Endocrinology*: 141, 3172-3182.

Bradford, M. [1976]: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding: *Anal. Biochem.*: 72, 248-252

Brann, D.W., Hendry, L.B. and Mahesh, V.B. [1995]: Emerging diversities in the mechanism of steroid hormones: *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*: 52, 113-133

Burger, K., Fahrenholz, f., and Gimpl, G. [1999]: Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors: *FEBS Letters*: 464, 25-29

Campbell, C.H., Bulayeva, N., Brown, D.B., Gametch, B., Watson, C.S. [2002]: Regulation of the membrane estrogen receptor- α : roll of cell density, serum, cell passage number, and estradiol: *FASEB J*: 16, 1917-1927

Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Wrangé, Ö., and Gustafsson, J.A. [1982]: Immunological analysis of the glucocorticoid receptor: identification of a third domain separated from the steroid-binding and DNA binding domains: *Proc. Natl. Acad. Sci.*: 79, 4460-4264

Carlstedt-Duke, J., Strömstedt, P.E., Wrangé, Ö., Bergmen, T., Gustafsson, J.A., and Jörnvall, H. [1987]: Domain structure of the glucocorticoid receptor protein: *Proc. Natl. Acad. Sci.*: 84, 4437-4440

Castoria, G., Barone, M.V., Di Domenico, M., Bilancio, A., Ametrano, D., Migliaccio, A. et al.: [1999]: Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA sythesis: *EMBO Journal*: 18, 2500-2510

Cattaneo, A., Biocca, S., Corvaja, N. Calissano, P. [1985]: Nuclear localization of a lactic dehydrogenase with single-stranded DNA-binding properties: *Exp. Cell Res.*: 161, 130-140

Chait, B.T., and Kent, S.B. [1992]: Weighing naked proteins: practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins: *Science*: 257, 1885-1894

Chang, L., and Karin, M. [2001]: Mammalian MAP kinase signalling cascades: *Nature*: 410, 37-40

Chomczynski, P. [1992]: One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting DNA and RNA: *Anal. Biochem.*: 201, 134-139

Chomczynski, P. [1993]: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples: *Bio Techniques*: 15, 532-537

Chuang, K.C., Huang, D., Chen, Y., Short, S., Short, M.L., Zhang, Z., and Jungmann, R.A. [1995]: Identification of a silencer module which selectively represses cyclic AMP-responsive element-dependent gene expression: *Mol. Cell. Biol.*: 15, 6139-6149

Chomczynski, P. and Sacchi, N. [1987]: Single step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction: *Anal. Biochem.*: 162, 156-159

Civitelli, R. Kim, Y.S. Gunsten, S.L., Fujimori, A., Huskey, M., Avioli, L.V., and Hruska, K.A. [1990]: Nongenomic activation of the calcium message system by vitamin D metabolites in osteoblast-like cells: *Endocrinology* 127, 2253-2262

Clarke, L. and Carbon, J. [1976]: A colony bank containing synthetic ColEI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome: *Cell*, 9: 91-99

Dan, P., Cheung, J.C., Scriven, D.R., Moore, E.D. [2003]: Epitope dependent localization of estrogen receptor {alpha} but not {beta}, in en face arterial endothelium: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*: 284, H1295-H1306

Endoh, H., Sasaki, H., Maruyama, K., Takeyama, K., Waga, I., Shimizu, T. *et al.* [1997]: Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line: *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 235, 99-102

Faber, H. von und Haid, H. [1980]: *Endokrinologie, Biochemie und Physiologie der Hormone*: UTB: 74-83

Falkenstein, E. and Wehling, M. [2000]: Nongenomically initiated steroid actions: *Eur. J. Clin. Invest.*: 30, 51-54

Falkenstein, E., Heck, M., Gerdes, D., Grube, D., Christ, M., Weigel, M., Buddhikot, M., Meizel, S., and Wehling, M. [1999]: Specific progesterone binding to a membrane protein and related nongenomic effects on Ca²⁺-fluxes in sperm: *Endocrinology*: 140, 5999-6002

Falkenstein, E., Norman, A.W. and Wehling, M. [2000]: Mannheim Classification of Nongenomically Initiated (Rapid) Steroid Action(s): *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*: 85, 2072-2075

Falkenstein, E., Tillmann, H.-C., Christ, M., Feuring, M. und Wehling, M. [2000]: Multiple actions of steroid hormones – A focus on rapid, nongenomic effects: *Pharmacol Rev*: 52, 513-555

Feinberg, A.P., Vogelstein, B.H. [1984]: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high Specific activity: *Anal. Biochem. Add.*: 137, 266-267

Freedman, L.P. [1992]: Anatomy of the steroid receptor zinc finger region: *Endocr. Rev.*: 13, 129-145

Freedman, L.P., Luisi, B.F., Korszun, Z.R., Basavappa, R., Sigler, P.b. and Yamamoto, K.R. [1988]: The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain: *Nature*: 334, 543-546

Gametchu, B. [1987]: Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: Correlation to cell lysis: *Science*: 236, 456-461

Garcia Dos Santos, E., Dieudonne, M.N., Pecquery, R., Le Moal, V., Giudicelli, Y., and Lasca, D. [2002]: Rapid nongenomic E₂ effects on P42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes: *Endocrinology*: 143, 930-940

Gee, K.W. [1988]: Steroid modulation of the GABA/benzodiazepine receptor-linked chloride ionophore: *Molecular Neurobiology*: 2, 141-147

Grazzini, E., Guillon, G., Mouillac, B. and Zingg, H.H. [1998]: Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone: *Nature*: 392: 509-512

Green, S., Kumar, V., Thenlaz, I., Wahli, W. and Chambon, P. [1988]: The N-terminal DNA binding zinc finger of the oestrogen and glucocorticoid receptor determines target gene specificity: *EMBO J*: 7: 3037-3044

Grosse, F., Nasheuer, H.P., Scholtissek, S., Schomburg, U. [1986]: Lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase are single

-stranded DNA-binding proteins that affect the DNA-polymerase- α -primase complex: *Eur. J. Biochem.*: 160, 459-467

-
- Guo, Z., Krücken, J., Benten, W.P.M., and Wunderlich, F. [2002a]: Estradiol-induced Nongenomic Calcium Signaling Regulates Genotropic Signaling in Macrophages: *J. Biol. Chem.*: 9, 7044-7050
- Guo, Z., Benten, W.P., Krücken, J. and Wunderlich, F. [2002b]: Nongenomic testosterone calcium signaling. Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages: *Journal of biological Chemistry*: 277, 29600-29607
- Hammes, S.R. [2003] : The further redefining of steroid-mediated signaling: *PNAS* : 100, 2168-2170
- Hastie, N.D. and Bishop, J.O. [1976]: The expression of three abundance classes of messenger RNA in mouse tissues: *Cell*: 9, 761-774
- Hollenberg, S.M., and Evans, R.M. [1988]: Multiple and coordinative transactivation of the human glucocorticoid receptor: *Cell*: 55, 899-906
- Hsiao, P.W., Lin, D.L., Nakao, R., and Chang, C. [1999]: The linkage of Kennedy's neuron disease to ARA24, the first identified androgen receptor polyglutamine region-associated coactivator: *J. Biol. Chem*: 274, 20229-34
- Huckaby, S.S., Coneely, O.M., Beattie, W.G., Dobson, A.D.W., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. [1987]: Structure of the chromosomal chicken progesterone receptor gene: *Proc. Natl. Acad. Sci.*: 84, 8380-8384
- Huang, D., and Jugmann, R.A. [1995]: Transcriptional regulation of the lactate dehydrogenase A subunit gene by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: *Mol. Cell. Endocrinol.*: 108, 87-94
- Jenkins, J.D., Madden, D.P., and Steck, T.L. [1984]: Association of Phosphofructokinase and Aldolase with the Membrane of the Intact Erythrocyte: *Journal of Biological Chemistry*: 259, 9374-9378
- Joe, I., and Ramirez, V.D. [2001]: Binding of estrogen and progesterone-BSA conjugates to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the effects of the free steroids on GAPDH enzyme activity: physiological implications.: *Steroids*: 66, 529-538
- Jones, N. [1990] Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship: *Cell*: 61, 9-11
- Jones, R.D., English, K.M., Jones, T.H. and Channer, K.S. [2004]: Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action: *Clinical Science*: 107, 149-158

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H. *et al.* [1995]: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase: *Science*: 270, 1491-1494

Kaul, R.K., and Köhler, H. [1983]: Interaction of hemoglobin with band 3: a review: *Klin Wochenschr*: 6, 831-837

Kelly, M.J., and Wagner, E.J. [1999]: Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors: *Trends in Endocrinology and Metabolism*: 10, 369-374

Kemppainen, J.A., Lane, M.V., Sar, M., and Wilson, E.M. [1992]: Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones: *J. Biol. Chem.*: 267, 968-974

Kim J.-w., and Dang, C.V. [2005]: Multifaceted roles of glycolytic enzymes: *TRENDS in Biochemical Science*: 30, 142-150

Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L.I., O'Brien, C.A., Bodenner, D.L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G.B., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B., S. *et al.* [2002]: Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity: *Cell*: 104, 719-730

Kuemmerle, H.P., Spitzky, K.H. und Hitzenberger, G. [1985]: *Klinische Pharmakologie – 4. Auflage (2. Ergänzungslieferung)*: Ecomed: Band 2: III- 2.9.4

Kyhse-Anderson, J. [1984]: Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: *J. Biochem. Biophys. Meth.*: 10, 203-209

Lämmli, U.K. [1970]: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4: *Nature*: 227, 680-685

Le Mellay, V., Groose, B. and Lieberherr, M. [1997]: Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol: *Journal of Biological Chemistry*: 272, 11902-11907

Le Mellay, V., Lasmoles, F., and Lieberherr, M., [1999]: G α (q/11) and G $\beta\gamma$ proteins and membrane signaling of calcitriol and estradiol: *Journal of Cellular Biochemistry*: 75, 138-146

Levin, E.R. [1999]: Cellular Functions of the plasma membrane estrogen receptor: *Trends in Endocrinology and Metabolism*: 10, 374-377

- Li, X., Qin, C., Burghardt, R., Safe, S. [2004]: Hormonal regulation of lactate dehydrogenase-A through activation of protein kinase C pathways in MCF-7 breast cancer cells: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: 320, 625-634
- Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Fredman, L.P., Yamamoto, K.R., and Sigler, P.B. [1991]: Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA: *Nature*: 352, 497-505
- Macara, I.G., and Cantley, L.C. [1983]: *Cell. Membr. Methods Rev.*: 1, 41-87
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., *et al.* [1995]: The nuclear receptor superfamily: The second decade: *Cell*: 83, 835-839
- Matrisian, L.M., Rautmann, G., Magun, B.E., and Breathnach, R. [1985]: Epidermal growth factor or serum stimulation of rat fibroblasts induces an elevation in mRNA levels for lactate dehydrogenase and other glycolytic enzymes.: *Nucleic Acids Res.*:13, 711-726
- McKenna, N.J., O'Malley, B.W. [2002]: Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators: *Cell*: 108, 465-474
- McMaster, G.K., and Carmichael, G.G. [1977]: Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 74, 4835-4838
- Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. [1999]: The protective effects of estrogend on the cardiovascular system: *New England Journal of Medicine*: 340, 1801-1811
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. *et al.* [1996]: Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells: *EMBO Journal*: 15, 1292-1300
- Murthy, S.N.P., Liu, T., Kaul, R.K., Köhler, H., and Steck, T.L. [1981]: The aldolase-binding site of the human erythrocyte membrane is at the NH₂ terminus of band 3.: *J Biol Chem.*: 256, 11203-11208
- Nakajima, T., Kitazawa, T., Hamada, E., Hazama, H., Omata, M., and Kurachi, Y. [1995]: 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca²⁺ currents in aortic smooth muscle cells: *European Journal of Pharmacology*: 294, 625-635
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Erhardt, W. [1988]: Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250: *Electrophoresis*: 9, 255-262

Neumann, F. [1991]: Androgene und Antiandrogene: PZ: 16, 959-969

Nordeen, S.K., Moyer, M.L., and Bona, B.J. [1994]: The coupling of multiple signal transduction pathways with steroid response mechanism: *Endocrinology*: 134, 1723-1732

Norfleet, A.M., Thomas, M.L., Gametchu, B., Watson, C.S. [1999]: Estrogen receptor- α detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry: *Endocrinol.*: 140, 3805-3814

Norman, A. W., and Litwack, G. [1987]: *Hormones*: Academic Press Inc.: 486-508

Pappas, T.C., Gametchu, B. Yannariello-Brown, J., Collins, T.J., Watson, C.S. [1994]: Membrane estrogen receptors in GH3/B6 cells are associated with rapid estrogen-induced release of prolactin: *Endocrine*: 2, 813-822

Pearson, G.Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. *et al.* [2001]: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions: *Endocrine Reviews*: 22, 153-183

Pearson, W.R. and Lipman, D.J. [1988]: Improved tools for biological sequence comparison: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*: 85, 2444-2448

Picard, D. [1998]: Steroids tickle cells inside and out: *Nature*: 392, 437-438

Pietras, R.J., and Szego, S.M. [1975]: Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature*: 253, 357-359

Pietras, R.J., and Szego, S.M. [1975]: Steroid hormone-responsive, isolated endometrial cells: *Endocrinology*: 96, 946-954

Pietras, R.J., and Szego, S.M. [1975]: Surface modifications evoked by estradiol and diethylstilbestrol in isolated endometrial cells: evidence from lectin probes and extracellular release of lysosomal protease: *Endocrinology*: 97, 1445-1454

Pietras, R.J., and Szego, S.M. [1977]: Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells: *Nature*: 265, 69-72

Pioli, P.A., Hamilton, B.J., Connolly, J.E., Brewer, G., Rigby, W.F. [2002]: Lactate dehydrogenase is an AU-rich element-binding protein that directly interacts with AUF1: *J. Biol. Chem.*: 277, 35738-35745

Polisky, B., Greene, P., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M., and Boyer, H.W. [1975]: Specificity of substrate recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease: Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 72: 3310-3314

Ponglikitmongkol, M., Green, S., and Chambon, P. [1988]: Genomic organization of the human estrogen receptor gene: EMBO J.: 7, 3385-3388

Pratt, W.B., and Toft, D.O. [1997]: Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones: Endocr. Rev.: 18, 306-360

Ramirez, V.D., Kipp, J.L., Joe, I. [2001]: Estradiol, in the CNS, targets several physiologically relevant membrane-associated proteins.: Brain Res. Brain Res. Rev.: 37, 141-152

Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J., and Levin, E.R. [2002]: Estrogen receptors associate with and regulate the production of caveolin: Implications for signaling and cellular actions: Mol. Endocrinol.: 16, 100-115

Reinboth, R. [1980]: Vergleichende Endokrinologie: Thieme Verlag: 95-163

Rosner, W., Hyrb, D.J., Khan, M.S., Nakhla, A.M., and Romas, N.A. [1998]: Androgens, estrogens, and second messengers: Steroids: 63, 278-281

Sackey, F.N.A., Watson, C.S., Gametchu, B. [1997]: Cell cycle regulation of membrane glucocorticoid receptor in CCRF-CEM human ALL cells – correlation to apoptosis: Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.: 36, E571-E583

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. [2001]: Molecular cloning. A laboratory manual: cold Spring Harbour Laboratory Press New York, USA

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. [1989]: Molecular cloning. A laboratory manual: cold Spring Harbour Laboratory Press New York, USA

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R: [1977]: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A: 74, 5463-5467

Seyffert, W., Gassen, H.G., Hess, O., Jäckle, H., and Fischbach K.F. [1998]: Lehrbuch der Genetik: Gustav Fischer Verlag

Shaul, P.W. [2002]: Regulation of endothelial nitric oxide synthase, location, location, location: Annu. Rev. Physiol.: 64, 749-774

Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla-Favera, R., and Dang, C.V. [1997]: c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.: 94, 6658-6663

Short, M.L., Huang, D., Milkowski, D.M., Short, S., Kunstman, K., Soong, C.J., Chung, K.C., and Jungmann, R.A. [1994]: Analysis of the rat lactate dehydrogenase A subunit gene promoter/regulatory region: Biochem. J.: 304, 391-398

Simental, J.A., Sar, M. Lane, M.V., French, F.S., and Wilson, E.M. [1991]: Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor: J. Biol. Chem.: 266, 510-518

Simoncini, T., and Genazzani, A.R. [2003]: Non-genomic actions of sex steroid hormones: European Journal of Endocrinology: 148, 281-292

Simoncini, T., and Genazzani, A.R. [2000]: Direct vascular effects of estrogens and selective estrogen receptor modulators: Current Pinion in Obstetrics and Gynecolgy: 12, 181-187

Smith, T.F., and Waterman, M.S. [1981]: Identification of common molecular subsequences: J. Mol. Biol.: 147, 195-197

Strapazon, E., and Steck, T.L. [1977]: Interaction of the aldolase and the membrane of human erythrocytes.: Biochemistry: 16, 2966-2971

Sylvia, V.L., Schwartz, Z., Schuman, L., Morgan, R.T., Mackey, S., Gomez, R., and Boyan, B.D. [1993]: Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D3 metabolites in chondrocyte cultures: J. Cell. Physiol.: 167, 271-278

Szego, C.M., and Davis, J.S. [1967]: Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A: 58, 1711-8

Tatusova, T.A., and Madden, T.L. [1999]: BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences: FEMS Microbiol. Lett.: 174, 247-250

Tesarik, J., and Mendoza, C. [1995]: Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential: Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism: 80, 1438-1443

Torres, J.M., Ruiz, E., and Ortega, E. [2003]: Development of a RT-PCR method to study 5 α -reductase mRNA isoenzymes in rat prostate in different androgen status: The Prostate: 56, 74-79

Tsai, I.-H., Murthy, S.N.P., and Steck, T.L. [1982]: Effect of red cell membrane binding on the catalytic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.: J Biol Chem.: 257,1438-1442

Valverde, M.A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M.I. *et al.* [1999]: Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit: *Science*: 285, 1929-1931

Vant Erve, Y., Voyta, J.C., Edwards, B., Kricka, L.J., and Bronstein, J. [1993]: Influence of reaction conditions on the chemiluminiscent dephosphorylation of AMPPD: *Bioluminescence and Chemiluminescence*. Szalay, A., Kricka, L.J., and Stanley, P. (eds), pp. 306-311, John Wiley, Chichester

Watson, C.S. [1999]: Signaling themes shared between peptide and steroid hormones at the plasma membrane: *Science's STKE*

Watson, C.S., and Gametchu, B. [2003]: Proteins of Multiple Classes May Participate in Nongenomic Steroid Actions: *The Society for Experimental Biology and Medicine*: 228, 1272-1281

Watson, C.S., and Lange, C.A. [2005]: Steadying the boat: integrating mechanisms of membrane and nuclear-steroid-receptor signalling: *Meeting on Steroid Hormone Receptors: EMBO reports*: 6, 116-119

Watters, J.J., Campbell, J.S., Cunningham, M.J., Krebs, E.G. and Dorsa, D.M. [1997]: Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and *c-fos* immediate early gene transcription: *Endocrinology*: 138: 4030-4033

Weigel, N.L., and Zhang, Y. [1998]: Ligand-independent activation of steroid hormone receptors: *Journal of Molecular Medicine*: 76, 469-479

Williams, K.R., Reddigari, S., Patel, G.L. [1985]: Identification of a nucleic acid helix-destabilizing protein from rat liver as lactate dehydrogenase-5: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*:82, 5260-5264

Winnacker E.L. [1990]: *Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie*: VCH

Wrange, Ö., and Gustafsson, J.A. [1978]: Separation of the hormone- and DNA binding sites of the hepatic glucocorticoid receptor by means of proteolysis: *J. Biol. Chem.*: 25, 856-865

Wrange, Ö., Okret, S., Radojčić, M., Carlstedt-Duke, J., and Gustafsson, J.A. [1984]: Characterization of the purified activated glucocorticoid receptor from rat liver cytosol: *J. Biol. Chem.*: 259, 4534-4541

Wyckoff, M.H., Chambliss, K.L., Mineo, C., Yuhanna, I.S., Mendelsohn, M.E., Mumby, S.M. *et al.* [2001]: Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through $\alpha(i)$: *Journal of Biological Chemistry*: 276, 27071-27076

Yang, T.-T., Sinai, P., Kitts, P.A., and Kain, S.R. [1997]: Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system: *BioTechniques*: 23, 1110-1114

Zheng, L., Roeder, R.G., Luo, Y. [2003]: S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component: *Cell*: 114, 255-66

Zhou, Z.X., Wong, C.I., Sar, M., and Wilson, E.M. [1994]: the androgen receptor: an overview: *Rec. Prog. Horm. Res.*: 49, 249-274

Zhu, Y., Bond, J., and Thomas, P. [2003b]: Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor: *PNAS*: 100, 2237-2242

Zhu, Y., Rice, S.D., Pang, Y., Pace, M., and Thomas, P. [2003a]: Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes: *PNAS*: 100, 2231-2236

7.0 Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMV	„avian myoblastosis virus“
A_{nm}	Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AR	Androgenrezeptor
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca^{2+}	Calcium
cDNA	copy-DNA
cfu	colony forming unit
CLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie
cm, mm, μ m, nm	Zenti-, Milli-, Mikro-, Nanometer
Da	Dalton
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphat-Mischung
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
E ₂	Estradiol
E ₂ -BSA-FITC	Estradiol-Rinderserumalbumin-Fluorescein-Isothiocyant
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estrogenrezeptor
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyant
g, kg, mg, μ g, ng, pg	Gramm, Kilo-, Milli-, Mikro-, Nano-, Pikogramm
GPCR	G-protein coupled receptor
h, min, sek	Stunde, Minute, Sekunde
HRE	Hormone Response Element

HRP	horseradish peroxidase
iAR	intrazellulärer Androgenrezeptor
IR	infrarotes Licht
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Medium
kDa	Kilodalton
l, ml, μ l	Liter, Milli-, Mikroliter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M, mM, μ M, nM, pM	Molar, Milli-, Mikro-, Nano-, Pikomolar
mA	Milliampere
mAR	membranständiger Androgenrezeptor
MCS	'multiple cloning site'
mRNA	'messenger'-RNA
OD _{nm}	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pfu	plaque forming units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minutes)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHR	Steroidhormonrezeptor
SR	Steroidrezeptor
TBE	Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
Te	Testosteron
Te-BSA-FITC	Testosteron-Rinderserumalbumin-Fluorescein-Isothiocyanat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylenethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur der Primer
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
Tween-20	Polyethylensorbitanmonolaurat
U	Einheit der Enzymaktivität
üN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	volume per volume
Vol	Volumen
w/v	weight per volume

8.0 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des International Graduate College 'Molecular Mechanisms of Food Toxicology' durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Frank Wunderlich danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, seine engagierte Betreuung sowie seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Professor Dr. Heinz Mehlhorn bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke der DFG für die Gewährung ihrer großzügigen finanziellen Unterstützung im Rahmen des Stipendiums.

Bei Frau Professor Dr. Regine Kahl möchte ich mich ganz herzlich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihr Engagement rund um das Fach Toxikologie bedanken.

Bei Herrn Dr. Jürgen Krücken und Herrn Dr. Schmitt-Wrede möchte ich mich sehr herzlich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und ihre enorme Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Predrag Marinovski, Herrn Priv. Doz. Peter Benten, Herrn Dr. Epe, Herrn Dr. Olaf Stamm und Frau Andrea Grunwald danke ich für ihre Geduld und uneingeschränkte Unterstützung – sowohl wissenschaftlich als auch privat.

Ich danke allen anderen Kollegen der Molekularen Parasitologie, meines Graduiertenkollegs und meinen „Holländern“: Ohne Euch wär die Zeit nur halb so schön gewesen!

Ich danke meinen Freunden Ralf Hosse, Nina Falkenroth, Kerstin Zorn, Juliane Beier, Sybille Schönfeld, Regina Schroetel und meiner Ex-Diplomandin Jessica Lüsebrink (auf die ich sehr stolz bin)!

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Schwestern Inken und Julia und meinem Freund David Horbach bedanken: Ich liebe Euch von ganzem Herzen!

9.0 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Nadine Tillmanns
Geburtsdatum	02.06.1977
Geburtsort	Mönchengladbach
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

08/1983 – 07/1987	Katholische Grundschule 'St. Dionysius', Kleinenbroich
09/1987 – 06/1996	Gymnasium Korschenbroich, Korschenbroich

Studium

10/1996 – 03/2002	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/2002 – 03/2005	Stipendiatin des International Graduate College 'Molecular Mechanisms of Food Toxicology' der DFG und Promotion in der Abteilung für Molekulare Parasitologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

"My business is to teach my aspirations to conform themselves to fact, not to try and make facts harmonise with my aspirations."

Thomas Henry Huxley