

Expression von Corticosteroid-bindendem Globulin
(CBG) in neuronalen Zellen *in vivo* und *in vitro*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae
(Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von k. m. n. (Univ. Saransk) Larissa Pusch

geboren am 20. 01. 1970 in Krasnoslobodsk, Russland

von Sonja Wegmann

geboren am 22. 11. 1983 in Erlangen, Deutschland

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Gustav Jirikowski
Institut für Anatomie II, Friedrich-Schiller-Universität
Jena

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Mawrin
Abteilung für Neuropathologie, Klinikum der
Friedrich-Schiller-Universität

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wöfl
Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie
Abteilung Biologie, Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Tag der Verteidigung : 04.11.2008

Abkürzungsverzeichnis

1321N1	Humane Astrozytom-Zelllinie
A 172	Humane Glioblastom-Zelllinie
ABP	Androgen-bindendes Protein
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
BG	Bindendes Globulin
BNST	<i>Bed nucleus der Stria terminalis</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Centi
CBG	Corticosteroid-bindendes Globulin
cDNA	Komplementäre DNA
CRF/CRH	<i>Corticotropin Releasing Factor/Hormone</i> (Corticoliberin)
CSF	<i>Liquor cerebrospinalis</i>
kDa	Kilodalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DBTRG	Humane Glioblastom-Zelllinie
Dex	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EM	Eminentia mediana
g	Gramm
GC	Glucocorticoide
gCBG	Gliales Corticosteroid-bindendes Globulin
GR	Glucocorticoidrezeptor
h	Stunde
HC	Hydrocortison
hCBG	Humanes Corticosteroid-bindendes Globulin
HepG2	Humanes Leberzellkarzinom
HHL	Hypophysenhinterlappen
HVL	Hypophysenvorderlappen

l	Liter
LN405	Humane Glioblastom-Zelllinie
μ	Mikro
m	Milli
M	Mol
min	Minuten
nm	Nanometer
NPV	<i>Nucleus paraventricularis</i>
NSO	<i>Nucleus supraopticus</i>
OT	Oxytocin
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
RHHN	Regelkreis Hypothalamus – Hypophyse – Nebennierenachse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RU	Glucocorticoidrezeptorantagonist Mifepriston (RU 486)
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SNB19	Humanes Glioblastom
SNP	<i>Single Nucleotid Polymorphism</i>
U373	Humanes Glioblastom/ Astrozytom, Grad 3
VP	Vasopressin
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung	11
2.1	Gliale Hirntumoren	11
2.1.1	WHO-Klassifikation neuroepithelialer Tumoren	11
2.1.2	Steroide in der Therapie von Hirntumoren	13
2.1.3	Wirkung von Steroiden auf Gliomzellkulturen	14
2.2	Steroid-bindendes Protein in neuronalen Zellen	15
2.2.1	Corticosteroid-bindendes Globulin als Bindungspartner für Glucocorticoide	15
2.2.2	CBG: Struktur, Produktionsregulation und Lokalisation	19
2.2.3	Die biologische Rolle des CBGs	21
2.2.4	Genetische Defekte	21
3	Ziele der Arbeit	24
4	Material und Methoden	26
4.1	Material	26
4.1.1	Laborgeräte	26
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
4.1.3	Chemikalien, Antikörper und Enzyme	28
4.1.4	Puffer, Medien und Lösungen	29
4.1.5	Versuchstiere	31
4.1.6	Molekularbiologische Kits	31
4.1.7	Zelllinien	31
4.1.8	Stammlösungen	32
4.1.9	Primer und Sonden	32
4.1.10	Vektoren und Bakterienstämme	34
4.1.11	Medien zur Kultivierung von Bakterien	36
4.1.12	Software	36
4.2	Methoden	37
4.2.1	Tierversuche	37
4.2.1.1	Gewebegewinnung	37
4.2.1.2	Immunhistochemie	38

4.2.1.2.1	Streptavidin/Biotin-Methode	38
4.2.1.3	RNA-Isolation	39
4.2.1.4	cDNA-Synthese	40
4.2.1.5	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	40
4.2.2	Zellkultur	42
4.2.2.1	Kultivierungsbedingungen	42
4.2.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen	43
4.2.2.2.1	Streptavidin/Biotin-Methode	43
4.2.2.2.2	Indirekte-Immunfluoreszenz-Methode	43
4.2.2.2.3	Doppelimmunfärbung	45
4.2.2.3	RNA-Isolation	45
4.2.2.4	cDNA-Synthese	45
4.2.2.5	RT-PCR	45
4.2.2.6	Klonierung von DNA Fragmenten und Vektoren	45
4.2.2.6.1	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen	46
4.2.2.6.2	Restriktionsverdau von DNA	46
4.2.2.6.3	Ligation	46
4.2.2.6.4	Transformation	46
4.2.2.6.5	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräp) ...	47
4.2.2.6.6	Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA	47
4.2.2.7	Transfektion und transiente Überexpression der CBG in glialen Zellen	47
4.2.2.8	Proteinanalyse	49
4.2.2.8.1	Immunpräzipitation	49
4.2.2.8.2	Dialyse von Immunpräzipitaten	49
4.2.2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	49
4.2.2.8.4	Proteinidentifizierung durch <i>peptide mass fingerprint</i> (MALDI) ...	50
4.2.2.9	Bindungsassay und Bindungs-Dot-Blot	51
4.2.2.10	Sekretions-Dot-Blot	53
5	Ergebnisse	55
5.1	CBG im Zentralnervensystem der Ratte	55
5.1.1	Topografie CBG-positiver Zellen im Rattenhirn	55

5.1.2	RT-PCR.....	58
5.2	CBG in glialen Tumorzelllinien.....	60
5.2.1	Immunhistochemische Charakteristik maligner glialer Zellen.....	60
5.2.2	RT-PCR.....	67
5.2.3	Klonierung und Sequenzierung von CBG.....	68
5.2.4	Transfektion.....	76
5.2.5	Proteinanalyse.....	76
5.2.6	Bindungsassay und Bindungs-Dot-Blot.....	79
5.2.7	Sekretions-Dot-Blot.....	82
6	Diskussion.....	86
6.1	Topografie der Verteilung des CBGs im Rattengehirn.....	86
6.2	CBG in glialen Zellkulturen.....	92
6.3	Funktionelle Bedeutung von CBG in Zellkulturen.....	95
7	Schlussfolgerung und klinischer Ausblick.....	98
8	Literaturverzeichnis.....	100
9	Anhang.....	111
9.1	Danksagung.....	111
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung.....	112

1 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurden morphologische Untersuchungen zur Expression von Corticosteroid-bindendem Globulin (CBG) im Gehirn der Ratte durchgeführt. CBG-Immunreaktivität konnte in intakten männlichen Ratten im Hypothalamus, in den magnozellulären Kernen und in einzelnen Neuronen des *Nucleus paraventricularis* und des lateralen Hypothalamus nachgewiesen werden. Der *Nucl. suprachiasmaticus* und der *Nucl. arcuatus* enthielten einzelne parvozelluläre Neurone mit spezifischer CBG-Immunreaktion. Komplexe Netzwerke von immunpositiven Fasern wurden im lateralen Hypothalamus, der *präoptischen Region*, dem *Bed nucleus* der *Stria terminalis* (BNST) und entlang dem 3. Ventrikel beobachtet. Die immungefärbten Axone zeigten oft Varikositäten. Sowohl die interne als auch externe Schicht der *Eminentia mediana* (ME) wiesen zahlreiche immunpositive Axonbündel auf. Die Herringkörper des Hypophysenhinterlappens (HHL) zeigten ebenfalls eine spezifische Immunreaktivität, während die Pituizyten ungefärbt blieben. Ein Teil der Purkinjezellen des Kleinhirns und der Moosfasern ist ebenso CBG-positiv wie einige Pyramidenzellen im Hippocampus. Ferner traten immunpositive Zellen im Mesencephalon, im *Substantia grisea centralis* und in der *Medulla oblongata* auf. Ein kleiner Teil der Ependymzellen und Tanyzyten waren ebenfalls angefärbt. Diese Zellen gehören zur astrozytären Reihe. Mit RT-PCR bestätigten wir das Vorhandensein von CBG-mRNA in den verschiedenen Hirnregionen. Das bedeutet, dass diese Regionen in der Lage sind, CBG selbst zu synthetisieren.

Die vielfältige Lokalisation von CBG im Gehirn der Ratte deutet auf unterschiedliche funktionelle Eigenschaften, einschließlich neuroendokriner und neurohumoraler Funktionen, hin.

Von besonderer Bedeutung sind die Ergebnisse der Gliazell-Untersuchungen, da dieser Zelltyp in über 50 % der Fälle der Ursprung von Gehirntumoren ist. Trotz einiger Fortschritte in der Forschung sind Gliome noch immer die Tumorart mit der schlechtesten Prognose. Zur pharmakologischen Standardtherapie der Hirntumorbehandlung gehören heute Glucocorticoide (GC). Um 1960 wurde beobachtet, dass Glucocorticoide das Wachstum von Hirntumoren beeinflussen und die klinischen

Zusammenfassung

Auswirkungen des tumorassoziierten Ödems vermindern. Da die zugrunde liegenden Mechanismen bis heute noch nicht vollständig geklärt sind, haben wir uns im zweiten Teil der Arbeit mit humanen Gliomzellkulturen beschäftigt und funktionelle Experimente zur Expression und Sekretion von CBG durchgeführt. Gliazellen, insbesondere Astrozyten, übernehmen mehrere wichtige Funktionen im Gehirn. Sie sind zum einen für die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts sowie für die Metabolisierung von Mediatoren und Neurotransmittern zuständig, zum anderen bilden sie mit ihren Fortsätzen eine Komponente der Bluthirnschranke.

Von Astrozyten und glialen Tumoren ist bekannt, dass sie *in vitro* wie *in vivo* empfindlich gegenüber GC sind. Die biologische Verfügbarkeit der GC ist von der Bindung an ihr Transportprotein, das CBG, abhängig. Obwohl einige hormonempfindliche maligne Tumoren wie Brustkrebs, Ovarial- und Endometriumtumoren CBG exprimieren, ist über dessen Expression in glialen Tumoren bisher nichts bekannt. Um die mögliche Beteiligung von CBG an der intrazellulären Steroidwirkung in menschlichen Gliomen zu verstehen, wurde in verschiedenen glialen Zelllinien die Expression einer CBG-mRNA mithilfe von RT-PCR untersucht. Während eine CBG-Expression in niedrig malignen Astrozytomzellen 1321N1 detektiert werden konnte, wurde in den Tumorzelllinien A172, U373 und CCF-STTG1 kein Nachweis dafür gefunden.

Die gliale CBG-mRNA (gCBG) zeigte eine 94 %ige Übereinstimmung mit den NCBI-Datenbank-Sequenzen der menschlichen CBG-mRNA. Unterschiede zwischen den bekannten CBG-Transkripten und den gCBG-Transkripten führen zu der Annahme, dass die abgeleitete, 400 Aminosäuren lange gCBG-Proteinsequenz zu 89 % identisch (94 % ähnlich) mit dem menschlichen CBG ist.

Mit Bindungs- und Dot-Blot-Assays haben wir die funktionelle Bindungsaktivität von glialem CBG nachgewiesen. Immunhistochemische Analysen haben gezeigt, dass CBG im Zytoplasma fast aller 1321N1-Zellen zu finden ist. Während wir mit RT-PCR die mRNA der Glucocorticoidrezeptor-Subtypen α und β in den Zellen nachweisen konnten, wurde bei einer Doppelimmunfärbung eine GR-Immunreaktion nur in einzelnen Zellen sichtbar. CBG wurde auch im Kulturmedium der Astrozytomzellen 1321N1 detektiert. Weiter konnte mit einem Sekretionsexperiment gezeigt werden, dass das von den 1321N1-Zellen sezernierte CBG unter normalen Kulturbedingungen

Zusammenfassung

nur nach bestimmten Kultivierungszeiten (4 h und 24 h) nachweisbar ist. Ebenso konnte CBG-Immunreaktivität in den Überständen von mit 0,5 µg/ml Hydrocortison (HC) behandelten Zellkulturen entdeckt werden. Eine Behandlung mit dem GR-Agonisten Dexamethason zeigte hingegen keine Wirkung. Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit HC und dem GR-Antagonisten RU486 konnte die Freisetzung des CBG nicht hemmen.

Mit der MALDI-TOF-Proteinanalyse konnte CBG in den Immunpräzipitaten der Zelllinie 1321N1 identifiziert werden.

Unsere Beobachtungen zeigen, dass CBG endogen in Astrozytomzellen exprimiert wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass das im Tumor gebildete CBG funktionell aktiv ist und unter normalen Kulturbedingungen sezerniert wird. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass HC die CBG-Sekretion positiv beeinflusst. Aufgrund der Tatsache, dass GR-Agonisten und -Antagonisten keinen Einfluss auf die Freisetzung von CBG ausüben, ist es denkbar, dass das Signal zur CBG-Freisetzung nicht über den klassischen Kernrezeptor vermittelt wird. Wir vermuten, dass sich HC an die freigesetzten CBGs bindet und der Komplex auf die Zelle zurückwirkt, um seine Effekte zu vermitteln.

2 Einleitung

2.1 Gliale Hirntumoren

2.1.1 WHO-Klassifikation neuroepithelialer Tumoren

In den USA beträgt die Inzidenz primärer intrakranieller Tumoren jährlich ca. 11 pro 100.000 Einwohner. Die histologische Klassifikation der WHO berücksichtigt die zytogenetische Herkunft der Hirntumoren und unterscheidet bis zu vier Malignitätsgrade (WHO-Grade I – IV). Gliome (52 %) sind mit großem Abstand die häufigsten Tumoren des Zentralnervensystems (Tabelle 2.1-1). Die restlichen 48 % teilen sich auf Meningeome (24 %), Hypophysenadenome (8 %), Schwannome (6,5 %), primäre ZNS-Lymphome (4 %) und andere, zum Teil sehr seltene Tumoren (5,5 %), auf.

Die Tatsache, dass gliale Tumoren nicht nur die häufigsten, sondern trotz der Fortschritte in der klinischen Forschung auch die Tumoren mit der schlechtesten Prognose sind, macht es verständlich, dass der Erwerb weiterer Kenntnisse hinsichtlich Ätiologie, Pathophysiologie und Therapie dringend erforderlich sind.

Die Diagnostik glialer Tumoren hat sich in den letzten Jahren deutlich verbessert. Zum einen sind durch die biochemische und molekularbiologische Forschung neue Kenntnisse über Entstehung und Progression der Tumoren gewonnen worden. Zum anderen wurden spezifische Marker für eine sichere Einteilung und eine bessere diagnostische Beurteilung entdeckt. Die Bemühungen um neue therapeutische Behandlungsmethoden sowie um ein besseres Verständnis der Wirkungsmechanismen der momentan therapeutisch eingesetzten Arzneistoffe sind Gegenstand laufender Forschungsprojekte.

	Tumor- familie	Tumorentität (WHO-Grad)	Anteil [%]	Alter bei Diagnose	Überlebens- rate (2 Jahre)	Überlebens- rate (5 Jahre)
Gliale Tumoren (52 %)	Astrozytäre Tumoren	Pilozytisches Astrozytom (I)	2	17	91	82
		Diffuses Astrozytom (II)	13	47	67	49
		Anaplastisches Astrozytom (III)	4	50	46	31
		Glioblastom (IV)	23	62	9	3
	Oligodendro- gliome	Oligodendrogliom (II)	3	41	80	63
		Anaplastisches Oligo- dendrogliom (III)	1	46	61	38
	Mischgliome	Oligoastrozytom (II)				
		Anaplastisches Oligoastrozytom (III)				
	Ependymale Tumoren	Subependymom (I)	<1	60	90	75
		Ependymom (II)	6	25	70	50
		Anaplastisches Ependymom (III)				

Tabelle 2.1-1 WHO-Klassifikation 2000 und klinisch relevante Daten zu Tumoren des zentralen Nervensystems.

2.1.2 Steroide in der Therapie von Hirntumoren

Gehirntumoren exprimieren zum Teil nukleäre Glucocorticoidrezeptoren (GR) und sprechen so auf eine Steroidbehandlung an (Inoue et al. 2002, Carroll et al. 1995, Paoletti et al. 1990). In der Klinik werden Steroide oft zur Therapie von tumorassoziierten Hirnödemen, die bei Patienten mit primären Hirntumoren auftreten, und in Kombination mit Zytostatika zur Behandlung primärer ZNS-Lymphome eingesetzt (Heiss et al. 1996). Da der intrakranielle Raum eine sehr begrenzte freie Volumenkapazität (ca. 5% des gesamten Volumens) hat, kann selbst eine geringe Volumenzunahme zu einem gesteigerten intrakraniellen Druck bis hin zu einer Durchblutungsstörung führen. Da der Hirndruck bei intrakraniellen Tumoren aufgrund der Raumforderung und des vasogenen Hirnödems (Stummer 2007) meistens eine kritische Auswirkung auf das Krankheitsbild hat, werden Corticosteroide heute als fester Bestandteil der Hirntumorthherapie angesehen (Sinha et al. 2004, Heiss et al. 1996). So konnten durch die Einführung der perioperativen Gabe von Corticosteroiden Morbidität und Mortalität bei neurochirurgischen Interventionen deutlich gesenkt werden. Zudem wird Cortisol zur Prävention von unerwünschten Nebenwirkungen der Strahlentherapie und in der Palliativ-Medizin verwendet.

Die Steroide hemmen effektiv die tumorassoziierte Angiogenese (Sipos und Brem 2000). Da die Tumor-Entstehung und -Entwicklung auch von ihrer Neuvaskularisierung abhängen (Fischer et al. 2005), stellt dieser Mechanismus ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien dar.

Es ist außerdem bekannt, dass Glucocorticoide als negative Regulatoren der astrozytären Glutamatproduktion wirken (Crossin et al. 1997, Zschocke et al. 2005, Holbrook et al. 1981, Klegeris A 1997). Die von Gliomzellen sezernierten Transmitter wirken auf das den Tumor umgebende normale Gewebe neurotoxisch, wodurch die weitere Tumorausbreitung gefördert wird (Takano et al. 2001).

2.1.3 Wirkung von Steroiden auf Gliomzellkulturen

In-Vitro-Untersuchungen zeigten, dass Glucocorticoide auf Gliomzellen verschiedene und oftmals konträre Effekte ausüben. In einigen Gliomkulturen wirkten sie antiproliferativ (Crossin et al. 1997). Es wurde jedoch auch eine Proliferationsaktivierung nach Dexamethason-Behandlung protokolliert (Langeveld et al. 1992), ebenso Proliferationshemmung bei Verwendung von GR-Antagonisten (Pinski et al. 1993). Es wurde gezeigt, dass die bivalente Wirkung der Steroide auf neuroepitheliale Tumore durch den Steroidrezeptorstatus und die verwendete Steroiddosis zu erklären ist. Die Wirkung von niedrigen, proliferationsstimulierenden Dexamethason-Dosen ist rezeptorstatusabhängig. Höhere, wachstumshemmende Dosen wirken dagegen unselektiv (Paoletti et al. 1990). Interessanterweise zeigten sich auch einige Tumoren trotz fehlender Glucocorticoidrezeptoren sensitiv gegenüber einer Glucocorticoid-Behandlung.

Corticosteroide können die apoptoseinduzierte Wirkung von Zytostatika in Zellkulturen aufheben (Zhang et al. 2006). Dies geschieht durch die Aktivierung einer ganzen Reihe anti-apoptotischer Regulatoren, wie z. B. Bcl-x(L) und Bcl-2 (Webster et al. 2002, Ni Chonghaile et al. 2006). Dies spricht auf den ersten Blick gegen einen klinischen Einsatz von Steroiden. Allerdings belegen einige Studien, dass mit Steroiden behandelte Zellen ihren transformierten Phänotyp und das maligne Potential verlieren (Vedoy und Sogayar 2002).

Die oben beschriebenen Effekte deuten darauf hin, dass diese Hormone möglicherweise das Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptose-Gleichgewicht beeinflussen und maligne Zellen zur Differenzierung zwingen können.

Insgesamt gesehen üben Steroide offenbar eine klinisch relevante Wirkung auf die neuronalen Zellen aus, die jedoch noch nicht vollständig geklärt ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit, die Funktion des CBG *in vitro* und *in vivo* in neuronalen Zellen zu darzustellen.

2.2 Steroid-bindendes Protein in neuronalen Zellen

2.2.1 Corticosteroid-bindendes Globulin als Bindungspartner für Glucocorticoide

Steroide kommen ubiquitär in Tieren, Pflanzen und Pilzen vor. Die lipophilen Verbindungen sind in der Lage, Membranen leicht zu überwinden und so Signale an die Zelle zu übermitteln. Sie dienen dem Organismus somit als Botenstoffe.

Allerdings müssen sie aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften beim Transport in der Blutbahn an Trägerproteine gekoppelt werden. Bis heute wurde zu fast jedem bekannten Steroid ein spezielles Transportprotein, ein bindendes Globulin (BG), gefunden (siehe Tabelle 2.2-1).

Hormon	Transportprotein
Estradiol	SHBG
Testosteron	SHBG/ABGP
Cortisol	CBG
Vitamin D	Vitamin D-BG
Retinol	Retinol-BG

Tabelle 2.2-1 Steroidhormone mit ihren bindenden Globulinen.

Glucocorticoide sind eine lebensnotwendige Klasse von Steroidhormonen, die eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des homöostatischen Gleichgewichts spielen, wie z. B. der Stimulation der Gluconeogenese in der Leber und der dadurch resultierenden Erhöhung des Blutzuckerspiegels. In der Muskulatur, den Knochen, der Haut sowie den lymphatischen Geweben stimulieren Glucocorticoide den Abbau von Eiweißen. Die dabei freigesetzten Aminosäuren werden dann in der Leber zur Gluconeogenese genutzt. Außerdem hemmen Glucocorticoide eine Reihe von Immun- und Entzündungsreaktionen. Glucocorticoide haben auch eine Wirkung auf das ZNS und spielen bei zentralen Mechanismen der Stressreaktion eine wichtige Rolle. Entsprechend ist ein vollständiger Glucocorticoid-Mangel mit dem Leben des

Organismus unvereinbar. Die Produktion der Stresshormone erfolgt in der Nebennierenrinde aus Cholesterin, gesteuert durch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH), das im Vorderlappen der Hypophyse produziert wird. Die Steuerung dieser Hormone wiederum erfolgt über den Hypothalamus und das *Corticotropin Releasing Hormone* (CRH) (Regelkreis Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenachse, RHHN) (Herman et al. 2003).

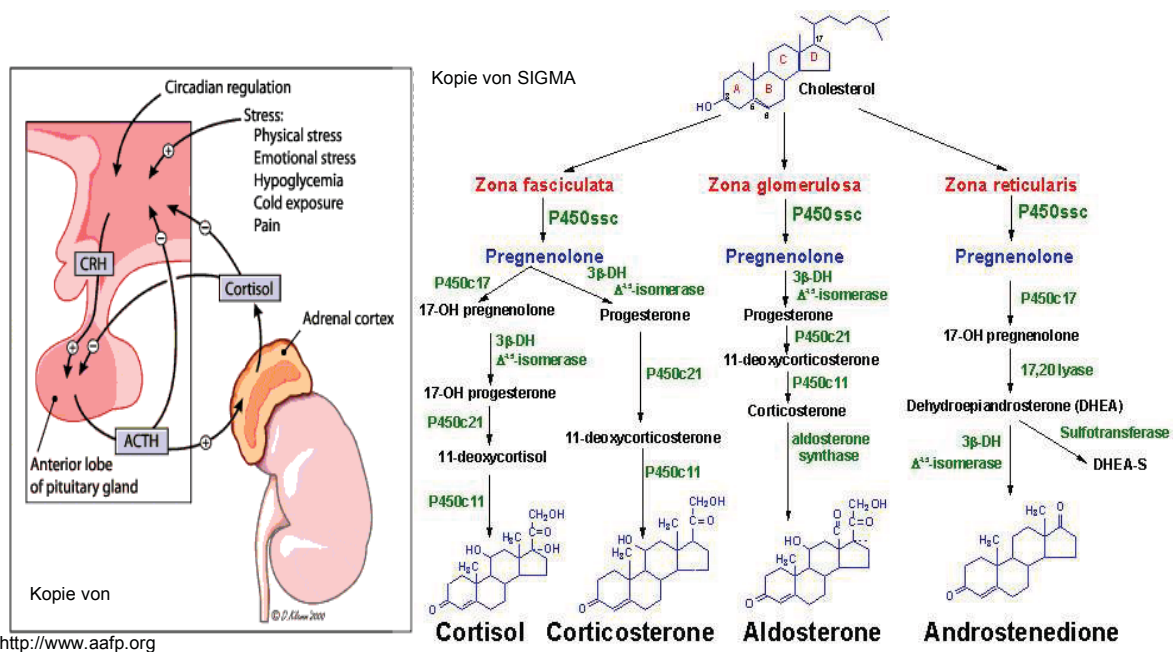


Abbildung 2.2-1 links: Regelkreis der Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenachse; rechts: Bildungsweg der Nebennierenhormone.

Die Steroide sind aufgrund ihrer Lipophilie in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren, und ermöglichen so eine negative Rückkopplung im RHHN. So kehrt die Cortisonkonzentration, beim Absetzen der Stressfaktoren, zu ihrer ursprünglichen Konzentration zurück (Abbildung 2.2-1).

Die Wirkung der Glucocorticoide auf zellulärer und molekularer Ebene in Zellen wird durch die Glucocorticoidrezeptoren (GR) vermittelt, welche zu ligandeninduzierten Transkriptionsfaktoren werden können. Die Glucocorticoid-Effekte resultieren somit aus der Stimulation oder Inhibition der Transkriptionsrate hormonsensitiver Zielgene. Das die GR kodierende Gen ist auf Chromosom 5 lokalisiert und besteht aus 10

Exons. Sein primäres Transkript wird durch alternatives Spleißen in zwei mRNA-Isoformen umgeschrieben, die schließlich zwei unterschiedliche Formen des GR-Proteins mit unterschiedlichen Funktionen generieren, GR α und GR β . Während GR α der „klassische“ Glucocorticoidrezeptor ist, der die bekannten Hormonwirkungen vermittelt, ist GR β unfähig zur Hormonbindung und wirkt als Antagonist von GR α (Bamberger et al. 1996).

Man unterscheidet DNA-bindungsabhängige und -unabhängige Mechanismen der GR-regulierten Genexpression (Beato et al. 1995). Der DNA-abhängige Mechanismus beginnt mit ligandeninduzierter GR-Dimerisierung, gefolgt von der Translokation des Dimers in den Kern und anschließend der Bindung an spezifische DNA Sequenzen, die *glucocorticoid response elements* (GREs) (Abbildung 2.2-2).

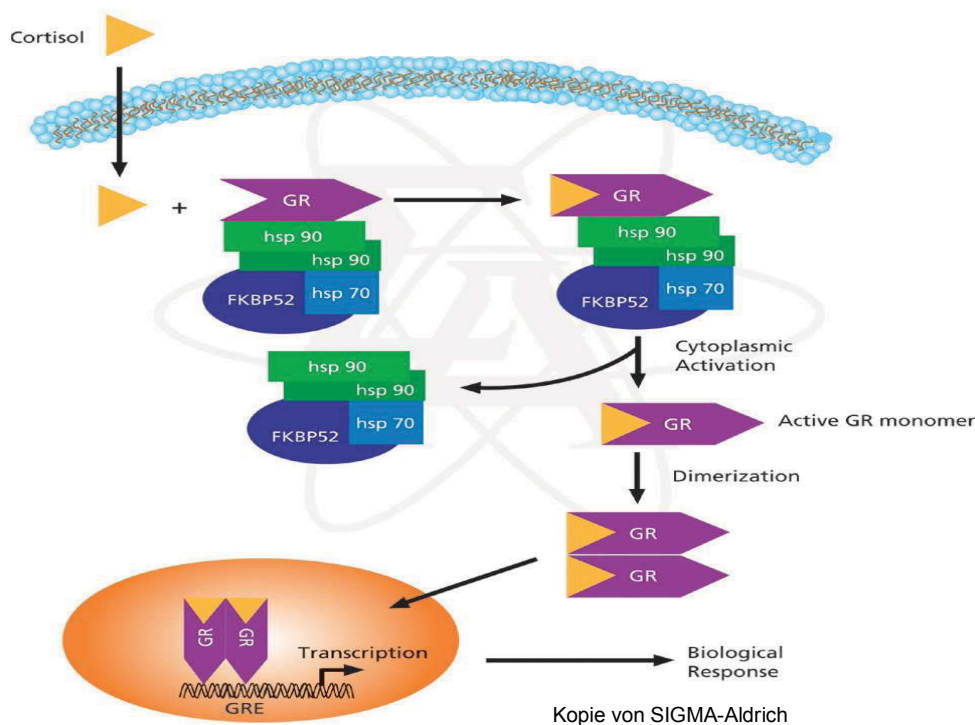


Abbildung 2.2-2 DNA-bindungsabhängige Mechanismen. Die Bindung des Hormons (GC) an den Rezeptor führt zu dessen Dissoziation vom Hitzeschockprotein-Komplex, zu Dimerisierung und nachfolgender Translokation in den Zellkern. Dort bindet das Dimer an *glucocorticoid response elements* (GREs) in der Promoter-Region spezifischer Zielgene und aktiviert so deren Transkription.

Bei DNA-bindungsunabhängigen Mechanismen interagiert der Corticoid-Rezeptor-Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Mukaida et al. 1994) oder dem *Activator Protein 1* (McKay und Cidlowski 1999) oder auch, wie im Fall der anti-entzündlichen Wirkung von Glucocorticoiden, der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt (Hafezi-Moghadam et al. 2002) und beeinflusst so die Übertragung intrazellulärer Signale. Außerdem wurde, vor kurzem, die Existenz von zellmembranassoziierten Rezeptoren für Corticosteroide postuliert, die schnelle, nicht-genomische Effekte vermitteln sollen. So führt die Inkubation von Neuronen des Hippocampus in Zellkultur mit Glucocorticoiden zu einer Erhöhung der postsynaptischen Erregbarkeit (EPSP) (Karst et al. 2005). In Neuronen des *Nucleus paraventricularis* führte die Inkubation mit GC zu einer Suppression der mEPSP-Frequenz, einem Effekt, der vermutlich durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt wird (Di et al. 2003, Dallman 2005). Das Wirkungsspektrum von Glucocorticoiden ist sehr breit und vor allem durch metabolische (Erhöhung der Blutzuckerkonzentration, besonders durch Steigerung der Gluconeogenese), kardiovaskuläre (Erhöhung des Blutdrucks) und komplexe zentralnervöse Effekte charakterisiert (Gould 1994). Darüber hinaus haben Glucocorticoide immunsuppressive Eigenschaften und können die Zellzyklusregulation beeinflussen. So wird nachvollziehbar, dass Glucocorticoide in vielen medizinischen Fachbereichen eingesetzt werden.

Die Wirksamkeit von Corticosteroiden kann durch mehrere Faktoren moduliert werden, so z. B. durch gewebespezifische Muster der Rezeptor-Expression, durch MDR-Glykoproteine (*multidrug resistance P glycoproteins*), welche aktiv Steroide durch die Blut-Hirn-Schranke schleusen (Karssen und EC 2001) oder durch die lokale Anwesenheit von steroidmetabolisierenden Enzymen (11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 11 β HSD u. a.). Ein wichtiger Faktor ist auch das Corticosteroid-bindende Globulin CBG als „Wächter“ über die biologische Verfügbarkeit der von ihm transportierten Hormone.

2.2.2 CBG: Struktur, Produktionsregulation und Lokalisation

Unter normalen Bedingungen ist das im Blutkreislauf zirkulierende Corticosteroid zu mehr als 95 % an sein Transportprotein, das Corticosteroid-bindende Globulin (CBG, Transcortin, SERPINA6), mit hoher Affinität gebunden (Westphal 1971).

Das Gen, welches das CBG codiert, ist auf dem langen Arm des Chromosoms 14 lokalisiert und besteht aus 6 Introns und 5 Exons (Abbildung 2.2-3).

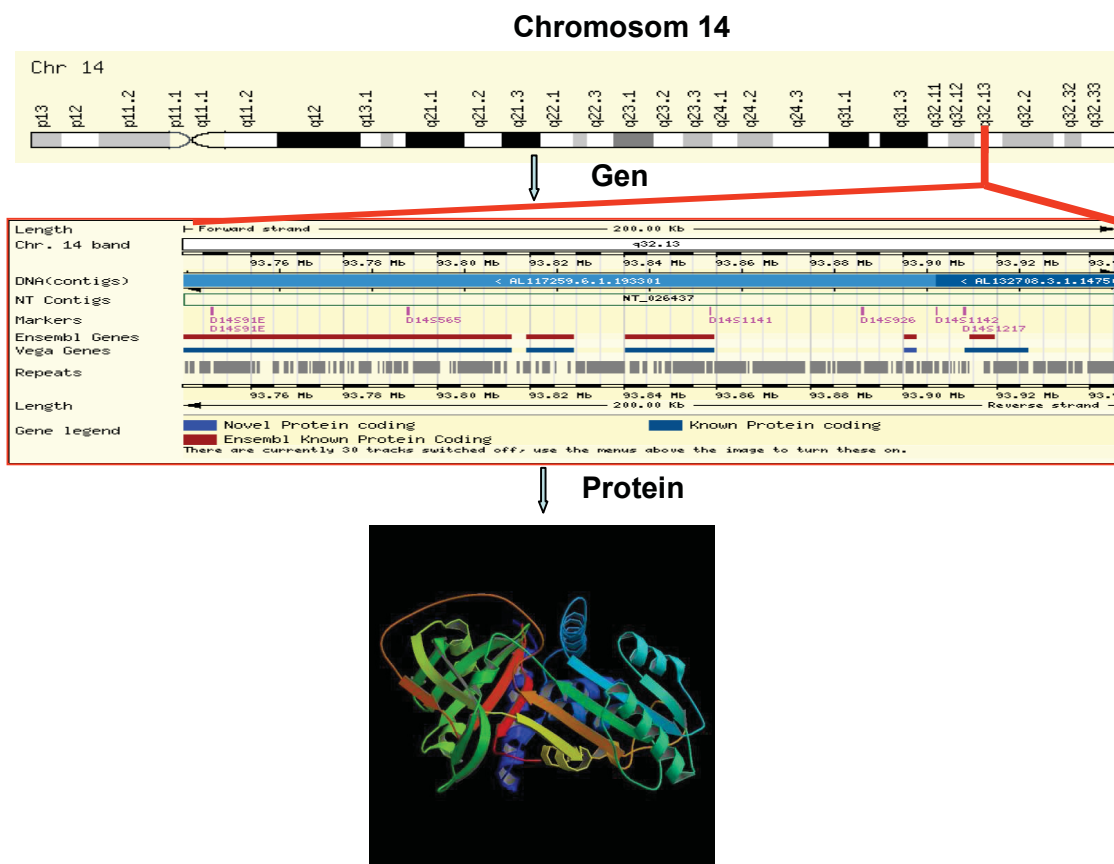


Abbildung 2.2-3 Schematische Darstellung von CBG-Gen und –Proteinstruktur.

CBG gehört zur Superfamilie der phylogenetisch verwandten Serin- (oder Cystein-) Proteinaseinhibitoren (Underhill 1989). Wie Antitrypsin besitzt es jedoch keine eigene Inhibitionsaktivität. Das primäre CBG-Transkript wird durch Spleißen zu einer 1476 bp langen RNA umgewandelt, die anschließend in ein 45,1 kDa (405 Aminosäuren)

schweres Protein translatiert wird. Um seine Bindungsaktivität zu erhalten, muss es an fünf Stellen glykosyliert werden, wobei besonders die Glykosylierung an Position 260 unerlässlich für die Steroidbindung ist (Avvakumov et al. 1993). Alle wichtigen Proteineigenschaften sowie signifikante SNPs (*single nucleotid polymorphisms*) sind in Tabelle 2.2-2 erfasst:

Eigenschaft	Position in Proteinsequenz	Beschreibung
Abschnitt	23-405	Corticosteroid-bindendes Globulin
Stelle	250	Konservative Cystein- innerhalb der Steroidbindungsdomäne
Modifikation	31	N-gebundene Glykosylierung (GlcNAc...)
Modifikation	96	N-gebundene Glykosylierung (GlcNAc...)
Modifikation	176	N-gebundene Glykosylierung (GlcNAc...)
Modifikation	260	N-gebundene Glykosylierung (GlcNAc...)
Modifikation	330	N-gebundene Glykosylierung (GlcNAc...)
Modifikation	369	N-gebundene Glykosylierung (GlcNAc...)
Variante	115	L→H „Leuven-Mutation“
Variante	246	S→A in dbSNP:rs2228541
Variante	389	D→N „Lyon-Mutation“

Tabelle 2.2-2 Wichtige Proteineigenschaften sowie signifikante SNPs des CBG.

Schließlich wird das 55 kDa schwere Glykoprotein in das Blut abgegeben. Hauptbildungsort ist die Leber (Berdusco et al. 1995). Aber auch in anderen Geweben wie Nieren (Scrocchi et al. 1993), Eileitern, Plazenta (Miska et al. 2004), Lunge, Hoden (Hammond et al. 1991) und weißem Fettgewebe (del Mar Grasa et al. 2001) wurde eine Produktion von CBG nachgewiesen. Die CBG-Bildung in der Leber und dessen Freisetzung werden durch verschiedene Faktoren wie Alter, Geschlecht, psychischen und/oder physischen Stress, aber auch durch Zytokine beeinflusst (Smith

und Hammond 1992, Mitrshahi et al. 2006, Breuner et al. 2006, Viau et al. 1996). Aufgrund seiner Größe kann das CBG die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren.

2.2.3 Die biologische Rolle des CBGs

Unter normalen Bedingungen bildet das im Blutkreislauf zirkulierende, freie Corticosteroid nur einen sehr geringen Anteil des gesamten Serumcorticosteroids. Nur dieser freie Anteil ist biologisch aktiv (*free hormon hypothesis*) (Petersen et al. 2006, Armelin 1973, Beishuizen et al. 2001), denn nur in diesem freien Zustand kann das Corticosteroid mit dem GR interagieren. Über die Serumkonzentration des CBG kann so die wirksame Konzentration des Steroids verändert werden (Breuner und Orchinik 2002).

Das CBG kann auch die schädlichen Auswirkungen von erhöhten Nebennierenhormonspiegeln abmildern oder gar verhindern, indem es die Clearance des zirkulierenden Cortisols beeinflusst (Hammond et al. 1991).

Weiterhin wurde von einigen Wissenschaftlern eine spezifische CBG-Rezeptorvermittelte Aufnahme der Steroide in Zielorgane postuliert (Orchinik et al. 1997, Nakhla et al. 1988). Schnelle, nicht-genomische Effekte von Glucocorticoiden, wie die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (Hryb et al. 1986, Maitra et al. 1993, Singer et al. 1988), könnten so erklärt werden. Membranassoziierte CBG-Rezeptoren wurden bis jetzt beim Menschen im Endometrium (Misao et al. 1998), in der Prostata (Cowan et al. 1976) und dem Synzytiotrophoblasten der Plazenta (Strel'chyonok und Avvakumov 1991) gefunden. Dies unterstützt unsere Annahme, dass das CBG eine weitere Rolle für die intrazellulären Signalwege spielt.

2.2.4 Genetische Defekte

Dass CBG eine wichtige Rolle in der Physiologie der Corticosteroide spielt, wurde durch die Entdeckung von Anomalien in der Genstruktur oder der Syntheseregulation noch deutlicher belegt. Die Forschung konnte bei mehreren Familien eine generationsübergreifend niedrige (Doe 1965, DeMoor 1967) oder erhöhte CBG-

Einleitung

Plasmakonzentrationen (Lohrenz 1968) nachweisen. Dabei waren alle Geschwister mit erhöhter CBG-Konzentration kinderlos. Ihre Eltern zeigten hingegen keine Abnormalität hinsichtlich der CBG-Blutspiegel. Torpy und seine Arbeitsgruppe (Torpy et al. 2001) untersuchten eine 39-köpfige Familie, deren Mitglieder eine Null-Mutation im CBG-Gen besaßen. Sie fanden heraus, dass eine Transition G→A in Position 121 im zweiten Exon zu einer Bildung eines neuen Stopp-Signals in der mRNA führte. Als Resultat war bei allen homozygot betroffenen Personen das CBG nicht detektierbar. Zudem wiesen die Personen nur sehr niedrige Cortisol-Blutspiegel auf. Alle Personen mit Null-Mutation zeigten eine hohe Prävalenz für das chronische Erschöpfungssyndrom und arterielle Hypertonie. Einige Familienmitglieder hatten zusätzlich eine Lyon-Mutation (Emptoz-Bonneton et al. 2000). Es handelt sich dabei um einen genetischen Polymorphismus (SNP 1254 G→A), der zu einer Aminosäure-Substitution an Position 367 des CBG-Proteins von Asp→Asn führt. Homozygote Menschen mit dieser Mutation sind anfällig für Asthenie und Bluthochdruck. Bei einer weiteren Variante des Leuven-Transcortin führt SNP T→A zu einer Substitution Leu→His an Position 93. Die Betroffenen zeigen ähnliche klinische Veränderungen, wie sie bei anderen abnormalen CBG-Transkripten auftreten.

Alle wichtigen bekannten Defekte im CBG-Gen sind in Abbildung 2.2-4 und Tabelle 2.2-2 (siehe oben) zusammengefasst.

```

1  ATCCACCGCAGGCTTACTGTACACATGCTAGGGTCCAGGACAGCAGGACCAAGCCAGCAG
61  AAACAGCCTGAGCCCACCGCAGACTGGCCTGGCTATACTGGACAATGCCACTCCTCCTGT
    .....-M--P--L--L--L--

121 ACACCTGTCTTCTCTGGCTGCCACCAGCGGCCTCTGGACCGTCCAGGCCATGGATCCTA
    6  Y--T--C--L--L--W--L--P--T--S--G--L--W--T--V--Q--A--M--D--P--

181 ACGCTGCTTATGTGAACATGAGTAACCATCACCGGGCCTGGCTTCAGCCAACGTTGACT
    26 N--A--A--Y--V--N--M--S--N--H--H--R--G--L--A--S--A--N--V--D--

241 TTGCCTTCAGCCTGTATAAGCACCTAGTGGCCTTGAGTCCCAAAAAGAACATTTTCATCT
    46 F--A--F--S--L--Y--K--H--L--V--A--L--S--P--K--K--N--I--F--I--

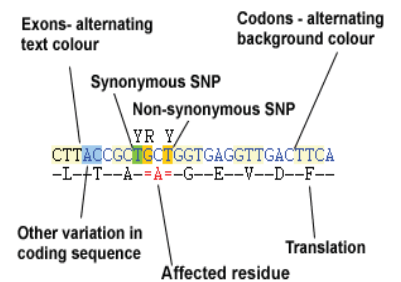
301 CCCCTGTGAGCATCTCCATGGCCTTAGCTATGCTGTCCCTGGGCACCTGTGGCCACACAC
    66 S--P--V--S--I--S--M--A--L--A--M--L--S--L--G--T--C--G--H--T--

361 GGGCCCAGCTTCTCCAGGGCCTGGGTTC AACCTCACTGAGAGGTCTGAGACTGAGATCC
    86 R--A--Q--L--L--Q--G--L--G--F--N--L--T--E--R--S--E--T--E--I--

421 ACCAGGGTTTCAGCACCTGCACCAA CTCTTTGCAAAGTCAGACACCAGCTTAGAAATGA
    106 H--Q--G--F--Q--H--L--H--Q--L--F--A--K--S--D--T--S--L--E--M--

    Y
481 CATGGGCAATGCCTTGT TTTCTTGATGGCAGCCTGGAGTTGCTGAGTCA TTCACGACG

```



126 T--M--G--N--A--L--F--L--D--G--S--L--E--L--L--E--S--F--S--A--

541 ACATCAAGCACTACTATGAGTCAGAGGTCTTGGCTATGAATTTCAGGACTGGGCAACAG
 146 D--I--K--H--Y--Y--E--S--E--V--L--A--M--N--F--Q--D--W--A--T--

601 CCAGCAGACAGATCAACAGCTATGTCAAGAATAAGACACAGGGGAAAATTGTCGACTTGT
 166 A--S--R--Q--I--N--S--Y--V--K--N--K--T--Q--G--K--I--V--D--L--

661 TTTCAAGGCTGGATAGCCAGCCATCCTCGTCTGGTCAACTATATCTTCTTCAAAGGCA
 186 F--S--G--L--D--S--P--A--I--L--V--L--V--N--Y--I--F--F--K--G--

721 CATGGACACAGCCCTTTGACCTGGCAAGCACCAGGGAGGAGAACTTCTATGTGGACGAGA
 206 T--W--T--Q--P--F--D--L--A--S--T--R--E--E--N--F--Y--V--D--E--

781 CAACTGTGTGAAGGTGCCCATGATGTTGCAGTCGAGCACCATCAGTTACCTTCATGACT^K
 226 T--T--V--V--K--V--P--M--M--L--Q--S--S--T--I--S--Y--L--H--D--=

841 CGGAGCTCCCTTGCCAGCTGGTGCAGATGAAC TACGTGGGCAATGGGACTGTC^RTTCTTCA
 246 S--E--L--P--C--Q--L--V--Q--M--N--Y--V--G--N--G--T--V--F--F--

901 TCCTTCCGACAAAGGGGAAGATGAACACAGTCATCGCTGCACTGAGCCGGGACACGATTA
 266 I--L--P--D--K--G--K--M--N--T--V--I--A--A--L--S--R--D--T--I--

961 ACAGGTGGTCCGCAGGCCTGACCAGCAGCCAGGTGACCTGTACATTCCAAAGGTCACCA
 286 N--R--W--S--A--G--L--T--S--S--Q--V--D--L--Y--I--P--K--V--T--

1021 TCTCTGGAGTCTATGACCT^YGGAGATGTGCTGGAGGAAATGGGCATTGCAGACTTGTTC A
 306 I--S--G--V--Y--D--L--G--D--V--L--E--E--M--G--I--A--D--L--F--

1081 CCAACCAGGCAAATTTCTCACGCATCACCCAGGA^YGCCAGCTGAAGTCATCAAAGGTGG
 326 T--N--Q--A--N--F--S--R--I--T--Q--D--A--Q--L--K--S--S--K--V--

1141 TCCATAAAGCTGTGCTGCAACTCAATGAGGAGGGTGTGGACACAGCTGGCTCCACTGGGG
 346 V--H--K--A--V--L--Q--L--N--E--E--G--V--D--T--A--G--S--T--G--

1201 TCACCCTAAACCTGACGTCCAAGCCTATCATCTTGCGTTTCAACAGCCCTTCATCATCA
 366 V--T--L--N--L--T--S--K--P--I--I--L--R--F--N--Q--P--F--I--I--

1261 TGATCTTC^RGACCACTTCACCTGGAGCAGCCTTTTCCT^RGCGAGGGTTATGAACCCAGTGT
 386 M--I--F--D--H--F--T--W--S--S--L--F--L--A--R--V--M--N--P--V--

1321 AAGAGACCACCCACCCAGAGCCTCAGCACTGTCTGACTTTGGGAACCAGGGATCCCACAG
 1217 AA.....

1381 AAATGTTTTGGAGAGCGGGAGGTTTTCCCCAATCTCCTCCAAGTTCTTCTCCCT^YCCAACC
 1441 AGAGTTGTGTCTAACTTTAGGCATCTTTTAATAAATGTCATTGCGACTCTG

Abbildung 2.2-4 Bekannte CBG-Transkript-Varianten. Erste Linie: CBG-mRNA-Transkript. Zweite Linie: Zusammenfassung bekannter wichtiger Transkriptions-Varianten. Dritte Linie: Auswirkungen der Transkriptions-Varianten auf die Proteinsequenz.

3 Ziele der Arbeit

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass im ZNS ein intrinsisches CBG-System existiert. CBG wurde in neuroendokrinen Zellen des Hypothalamo-neurohypophysären Systems sowie des adenohipophysären Systems der Ratte und des Menschen nachgewiesen. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des CBG *in vitro* und *in vivo* in neuronalen Zellen zu untersuchen.

Für die vorliegende Arbeit wurde mit immunhistochemischen und biochemischen Methoden im Gehirn der Ratte eine Bestandsaufnahme der CBG exprimierenden Zellen angefertigt. Von besonderem Interesse waren hier neuronale und gliale Zelltypen, deren topografisches Verteilungsmuster und CBG-Expression mit immunhistochemischen Methoden und RT-PCR-Charakterisierung dargestellt wurden. Zudem sollten zelluläre Bindepartner/Rezeptoren, deren Existenz vor kurzem postuliert wurde, mittels Affinitätschromatografie und anschließender MALDI-TOF-Analyse überprüft werden.

Glucocorticoide sind ein Teil der Standardtherapie von Gehirntumoren, obwohl ihr Wirkmechanismus bis heute noch nicht vollständig geklärt ist. Wissenschaftliche Untersuchungen zeigten für die Glucocorticoid-Behandlung von *in vitro* kultivierten Tumorzellen bisher sehr inkonstante, oftmals konträre Effekte. Aufgrund der sehr schlechten klinischen Prognose von Gliomen und der klinischen Bedeutung der Wirkung von Glucocorticoiden auf Gliazellen, wurden hier für die funktionellen Untersuchungen auf zellulärer Ebene gliale Zellkultursysteme verwendet. Es wurden verschiedene GC-sensitive Glioblastom- und Astrozytomlinien kultiviert und analog den Gewebeschnitten des Rattenhirns histochemisch und biochemisch untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf die Lokalisation von CBG und der Co-Lokalisation von CBG und GR gelegt. Ein weiteres Anliegen der Kulturexperimente war die Isolierung und Charakterisierung von *in vitro* exprimiertem CBG. Die Charakterisierung des CBG wurde mittels Klonierung und Sequenzierung der exprimierten mRNA durchgeführt. In weiteren Klonierungsverfahren sollte ein, das CBG-Gen enthaltender, eukaryontischer Expressionsvektor hergestellt werden.

Es wurden auch Bindungsexperimente durchgeführt, um das gliale CBG auf seine tatsächliche Funktionalität zu testen. Abschließend wurden Kulturen mit

Ziele der Arbeit

unterschiedlichen GR-Agonisten und -Antagonisten behandelt, um einerseits die Entwicklung der Zellen zu beobachten und andererseits die steroidabhängige Freisetzung von CBG in das Kulturmedium mit ELISA messen zu können. Damit sollten Erkenntnisse über eine mögliche Rolle von CBG in der Hormonsignalisierungskaskade erhalten werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Laborgeräte

2-D-Gelelektrophorese-Apparatur	Amersham Pharmacia Biotech
Agarosegelkammern	Biometra
BioDoc Analyze System	Biometra
Brutschrank	Heraeus
CanoScan Lide 500F	Canon
Chemiluminescence and Fluorescence Imaging System LAS 1000	Fujifilm
Dampfdrucksterilisator Autoklav P23	Melag
Digital Graphic Priter UP D897	Biometra
Digitalwaage Precisa 600 C	BioLab
Dispergiergerät	IKA
ELISA-Reader	Spectra, SLT
Geldokumentation	Biometra
Heizblöcke Thermomixer	Eppendorf
Kühlzentrifugen Rotanta	Hettich
Light Cycler	Roche
Magnetrührer IKAmag RCT	Jahnke & Kunkel
Mastercycler gradient	Eppendorf
Mikroskop Axiovert 100	Axiovert 100
Mini-PROTEAN Apparatur	BioRad
Personal Cycler	Biometra
pH-Meter	Biometra
Pipetten Finnpipette	Labsystems
Sequenziergerät LiCor 4000	LiCor 4000
Spectra max plus	Molecular Devices
Spektralphotometer NanoDrop	Peqlab

Material und Methoden

Sterile Werkbank	Heraeus
Thermocycler	Eppendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf
ULTRA-TURRAX® Dispergiergerät	IKA
Vortexer	IKA
Vibratome101	Cambridge Instruments
Wasserbad	Hettich
Zentrifuge 545 CUV	Eppendorf

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen, Omnifix	Braun
Chamberslids	Nunc
Deckgläschen	Wenzel
Falcons 15 und 50ml	Greiner bioone
Filterpapier	Whatman
Flachtiterplatten	Cytolabor Gmbh Berlin
Lab-Tek™ Chamber Slides™	Nunc
Mehrfachkulturschalen 24 und 96 wells	Nunc
Mikrotiterplatten, 96 well	Eppendorf
Objektträger	Wenzel/Merck
Pasteurpipetten, steril	Roth
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Roth
Plastikpipetten, 2,5,10 und 25 ml	Roth/Greiner Bio-One
PP-Röhrchen, steril, 15 und 50ml	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße 0,5 ml, unsteril	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 1.5 ml, unsteril	Roth
Sterilfilter, 0,2 µm	Sartorius

Zellkulturflaschen, 25 und 75 cm ²	Roth/ Greiner Bio-One
Zellschaber	Nunc
Zentrifugenröhrchen, 15 und 50 ml	Roth
LightCycler® Capillaries (100 µl)	Roche

4.1.3 Chemikalien, Antikörper und Enzyme

3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma
100 bp Ladder	Fermentas
Agarose Serva Premium	Serva
Albumin Fraktion aus Rinderserum	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin	AppliChem
anti-GFAP	Chemicon
	AK wurden uns
anti-CBG monoklonal	freundlicherweise von Lewis
	J. G. überlassen
	(Lewis et al. 2003)
anti-CBG polyclonal	Affiland
Anti-GR	Abcam
anti-mouse IgG	Sigma
anti-rabbit IgG	Sigma
anti-rabbit Cy3	Sigma
AquaTex Microscopy 00428506	Merck
Mouse monoclonal PAP	Sigma
BamH	NEB
Dexamethason	Sigma
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Hydrocortison	Sigma

IPTG	Fermentas
Methanol	Roth
Mifepriston, minimum (RU 486)	Sigma
Penicillin-Streptomycin GIBCO	Invitrogen
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen
Protein G-Agarose	Boehringer, Mannheim
pst I	NEB
pstI Ladder	Fermentas
RNAlater™	Qiagen
RNase A	Sigma
RNase Inhibitor	Ambion
Sequencing Grade Trypsin	Promega
Sigmafast Tablets sets	Sigma
Superscript RT	Invitrogen
TaqPolymerase	Qiagen
The LightCycler® DNA Master SYBR Green I	Roche
Trypsin, Sequencing Grade	Promega
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid)	Fermentas

4.1.4 Puffer, Medien und Lösungen

10 x TBS	30 g/l Tris-HCl; 90 g/l NaCl; 2 g/l KCl, pH 7,4
4 x Laemmli-Puffer	240 mM Tris pH 6,8; 400 mM DTT; 8 % SDS; 20 % Glycerol; 0,004 % Bromphenolblau
Coomassie-Lösung	50 % Methanol, 1 % Essigsäure, 1 % Coomassie Blau G
Conjugat-Lösung	Conjugate-Enzyme 1:5 in PBS
Cortisol-Lösung	9,36 ml PBS, 240 µl F und 100 µl Cortisol-Lösung (Kontr. 2) aus dem DRG-Kit
DAB-Lösung	20 ml PBS-T, 2 mg DAB-Pulver (Sigma), 2 µl 30 % H ₂ O ₂ und 2 µl 8 % NiCl ₂

Material und Methoden

Entwicklungslösung	2 % Na ₂ CO ₃ und 0,04 % Formaldehyd
IP-Lysispuffer	20 mM NaPO ₄ , 0,3 M NaCl, 0,1 % SDS, 1 % NP40, 0,02 % NaN ₃ , 0,5 % Natriumdesoxycholat
IP-Wasch-Puffer	PBS, 1 % Tween
LB-Agar	LB-Medium + 15 g/l Agar
LB-Medium (Luria broth)	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7,2
Medium RPMI 1640+Glutamax I	Gibco™, Invitrogen
PAA-Gel fixativ	50 % Methanol, 5 % Essigsäure
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,4 mM Na ₂ HPO ₄
PBS-T	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,4 mM Na ₂ HPO ₄ ; 0,1 % Triton
Paraformaldehydlösung	4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2
Puffer I	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase
Puffer II	0,2 M NaOH, 1,0 % SDS
Puffer III	3 M Natriumacetat pH 5,5
TBS-T	3 g/l Tris-HCl; 9 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 0,1 % Tween
Trypsin/EDTA	Gibco
WB Run-Puffer	0,1 % SDS, 80 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl pH 8,0
WB Transfer-Puffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % Methanol,
X-Gal-Stammlösung	2 % X-Gal (5-Bromido-4-chlorido-3-indolyl-β-D-galactosid) in DMSF

4.1.5 Versuchstiere

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden n=10 erwachsene männlich Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 300 g verwendet.

Bei den Untersuchungen an tierischem Material handelte es sich lediglich um Organentnahmen an getöteten Tieren. Tierversuche im Sinne des Tierversuchsgesetzes wurden nicht durchgeführt.

4.1.6 Molekularbiologische Kits

Es wurden folgende Reagenzien-Kits verwendet: *RNeasy Kit* (Qiagen); *R.T.U. Vectastain Kit* (Vector); *pGEM-T Vector System'* (Promega); *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), *LightCycler® DNA Master SYBR Green I* (Roche); *Gel extraction kit* (Biozym); *CycleReader Auto DNA Sequencing Kit* (Fermentas); *Effectene Transfection Reagent* (Qiagen), *Salivary Cortisol ELISA 96 tests SLV-2930* (DRG).

4.1.7 Zelllinien

Die humanen Glioblastom-Zelllinien A172 und U 373 und die humanen Leberkarzinom-Zellen HepG2 stammten von ATCC (Manassas, VA, USA), die humane Astrozytom-Zelllinie 1321N1 von ECACC (Salisbury, Wiltshire).

Die humanen Glioblastom-Zelllinien SNB19 und DBTRG sowie LN405, ein Astrozytom (Grad IV), waren von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig).

Die Zellen wurden routinemäßig in 75 cm²-Kulturflaschen mit 10 – 15 ml Medium (RPMI 1640+10 % FKS + Penicillin/Streptomycin, 100 E/100 µg/ml) bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt und die Zellen wurden einmal pro Woche unter Verwendung einer Trypsin/EDTA-Lösung subkultiviert.

4.1.8 Stammlösungen

Die RU486-Stammlösung (200mM RU486 in 100%igem Ethanol) wurde in zwei Schritten zur Arbeitskonzentration von 10 μ M verdünnt, um eine Ausfällung der Verbindung zu verhindern: 1. Schritt – 1:200 mit 50% Ethanol; 2. Schritt – 1:100 im Medium (RPMI 1640, ohne Phenolrot, ohne Penicillin/Streptomycin und ohne FKS). Es wurde mit einer Endkonzentration von 0,1 μ M gearbeitet.

Die Hydrocortison-Stammlösung wurde durch Lösen von 1 mg Hydrocortison in 1 ml 100%igem Ethanol hergestellt.

Die Dexamethason-Stammlösung (10 mM) wurde als kommerziell erhältliche Fertiglösung verwendet.

Für die in Kap. 4.2.2.1 beschriebenen Arbeiten erfolgten Verdünnungsschritte der Hydrocortison- und Dexamethason-Stammlösungen mit RPMI 1640. Alle Stammlösungen wurden in Portionen zu je 50 μ l bei -20°C gelagert.

4.1.9 Primer und Sonden

Die Suche nach geeigneten Primern wurde mit dem Programm *Primer3* (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) des Whitehead Institute for Biomedical Research (Cambridge, MA, USA) durchgeführt. Für die Auswahl passender Intron-überspannende RNA-Amplifikationsprodukte wurde das Programm *Blat* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) der UCSC Genome Bioinformatics Group (Santa Cruz, CA, USA) verwendet.

Folgende Primer wurden als Lyophilisat vom Institut für Virologie (FSU Jena) bezogen, in *Aqua dest.* aufgenommen (Endkonzentration 0.1 mM) und bei -20°C aufbewahrt (Tabelle 2.1-1).

Gen	Primer 5'→3'	Amplifikatgröße (bp)
hCBG	CATCCTCGTCCTGGTCAACT' GGACGTCAGGTTTAGGGTGA	538
BamHI- hCBG-pstI	AAAGGATCCGGCCTGGCTATACTGGACAA' AAACTGCAGTCTGGTTGGAGGGAGAAGAA	1376
Clal- hCBG_Eco RI	AAAGATATGCCACTCCTCCTGTACACC AAATTC TTACACTGGGTTTCATAACCC	1236
hActin	CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC	712
GR α	AAACTCTTGATTCTATGCATGAA TATTAATTCGACTTTCTTTAAGGCAA	316
GRβ	AAACTCTTGATTCTATGCATGAA CCACGTATCCTAAAAGGGCAC	321
rCBG	GGACTTGCTCACCAACCAAT AGGCTTCCATCCCTCAAAGT	302
rAktin	TGTCACCAACTGGGACGATA AGGGCAACATAGCACAGCTT	439
Sp6	GCTATTTAGGTGACACTATAG	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
M13	ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG	
M13 reverse	TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC	

Tabelle 4.1-1 Primersequenzen und ihre Amplifikatgröße

4.1.10 Vektoren und Bakterienstämme

Für die Klonierung von PCR-Produkten und durch Restriktionsverdau erzeugten DNA-Fragmenten wurden die Vektoren *pGEM[®]-T* der Firma Promega (Madison, WI, USA) und *pIRES-EGFP* der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet.

pGEM[®]-T (Abbildung 4.1-1). Dieser Vektor ist für die Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang geeignet. Er enthält im *lacZ α* -Gen und eine umfangreiche *multiple cloning site* (MCS). Außerdem sind Ampicillin-Resistenzgene für die Selektion von Transformanten und der *F1-ori* für die Replikation in *E. coli* vorhanden.

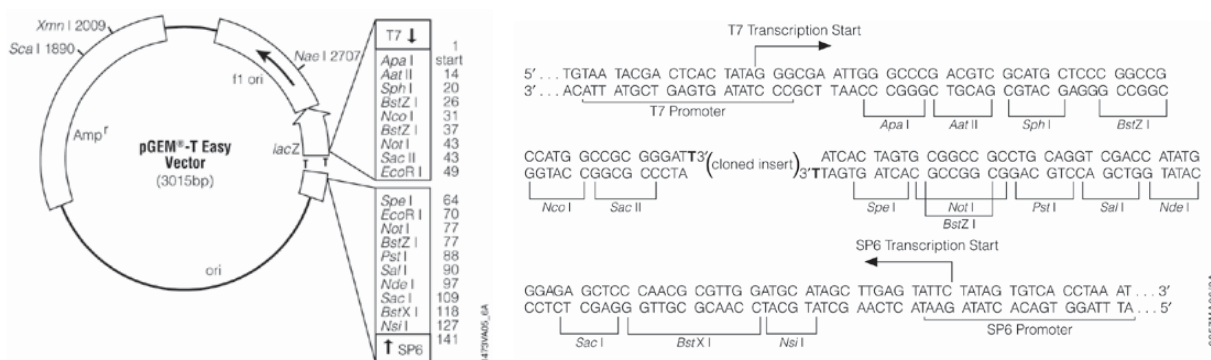


Abbildung 4.1-1. *pGEM-T-Easy*-Klonierungsvektor für PCR-Produkte mit *multiple cloning site*. Dargestellt sind das Ampicillin-Resistenzgen, der *F1-ori* und das *lacZ α* -Gen mit Promotor, die *multiple cloning site* (MCS) mit Darstellung der Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sowie die Bindestellen für die Sequenzierprimer SP6 und T7. Im *lacZ α* -Gen befindet sich das Startcodon ATG.

pIRES-EGFP (Abbildung 4.1-2) Das in diesem Vektor enthaltene Reporter gen kodiert für das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), ein Protein, das in der Zelle durch UV-Licht der Wellenlänge 488 nm zu einer Fluoreszenz mit der Emissionswellenlänge 507 nm angeregt werden kann. Die Zellen werden dabei nicht geschädigt. Außerdem verfügt das Plasmid über eine, dem EGFP vorangestellte, *internal ribosomal entry site* (IRES), eine DNA-Sequenz, die es ermöglicht, zwei Proteine unter der Kontrolle desselben Promotors zu exprimieren. Durch die gleichzeitige Expression zweier Proteine können transfizierte Zellen sichtbar gemacht werden. Es handelt sich um

einen Säugervektor. Er besitzt den Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor), ein Gen für Ampicillin-Resistenz und die kodierende Sequenz für EGFP. Dieser Vektor ist ein so genannter bicistronischer Vektor, d. h. EGFP und das in den Vektor klonierte Gen werden getrennt als einzelne mRNAs translatiert. Zwischen die Schnittstellen *BamHI* und *pstI* (im Leserahmen mit EGFP) wurde hCBG in die MCS kloniert. Dies ermöglichte in den transfizierten Zellen somit die gleichzeitige Expression von hCBG und EGFP.

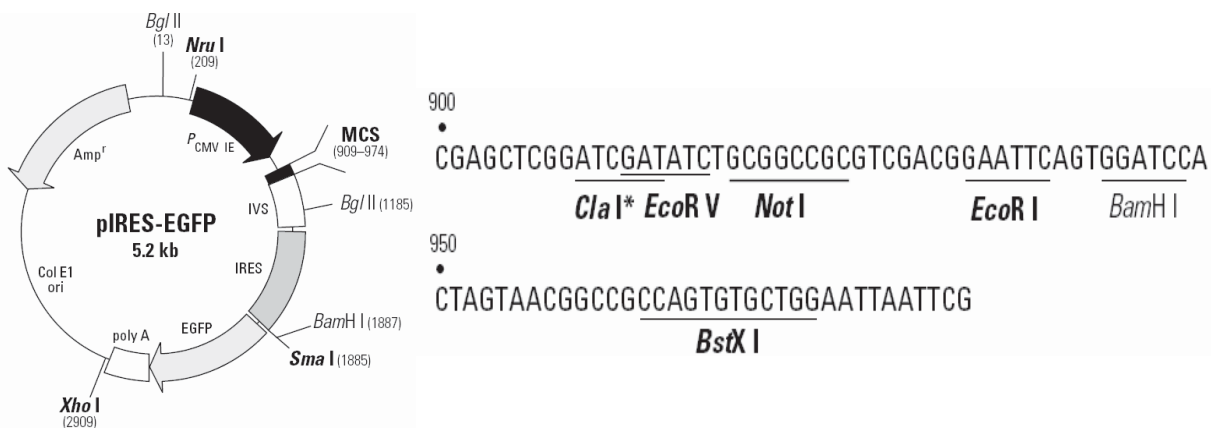


Abbildung 4.1-2 pIRES-EGFP-Vektor. Er besitzt den CMV-Promotor, ein Gen für Ampicillin-Resistenz und die kodierende Sequenz für EGFP. Dieser Vektor ist ein so genannter bicistronischer Vektor, das heißt EGFP und das einklonierte Gen werden getrennt von einer einzigen mRNA translatiert. hCBG wurde zwischen die Schnittstellen *BamHI* und *pstI* (im Leserahmen mit EGFP) in die multiple cloning site (MCS) kloniert. In einer transfizierten werden hCBG und GFP gleichzeitig exprimiert.

Die Klonierung von DNA- und PCR-Produkten wurden mit dem *Escherichia coli*-Stamm *DH5α* der Firma Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt.

4.1.11 Medien zur Kultivierung von Bakterien

Die Vermehrung von Bakterien erfolgte in LB-Medium, das mit *LB-Broth High Salt* der Firma Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande) nach Angaben des Herstellers zubereitet wurde. Die Plasmidselektion wurde auf festem Medium durchgeführt, das mit *LB-Agar High Salt* (Duchefa) ebenfalls nach Angaben des Herstellers hergestellt wurde. Für die Plasmidselektion wurde das Antibiotikum Ampicillin (100 mg/l) verwendet. Um das *lacZ* α -System nutzen zu können, wurden dem Medium X-Gal und IPTG (je 20 mg/ml) zugesetzt.

4.1.12 Software

Clone Manager (Sci Ed Central); **Primer3** (Whitehead Institute for Biomedical Research in Cambridge, Massachusetts, USA); **Blat** – BLAST-Like Alignment Tool (Kent 2002); **EMBL-EBI Fasta** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>); **NetNGlyc** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>); **Olympus DP** (Olympus); **Blast** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), **ProteinScape Gelviewer** Pack (Bruker Daltonik), **Software soft max Data pro 4.0** (Molecular Devices, Union City, USA), **Cyto 3.5** (Cytolabor GmbH Berlin), **BioDocAnalyze (Biometra GmbH, Göttingen)**, **Adope Photoshop CS** (Microsoft).

4.2 Methoden

4.2.1 Tierversuche

Als Versuchstiere wurden erwachsene, männliche Wistar-Ratten verwendet. Diese wurden unter Standardbedingungen in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Zur Präparation des Gehirns wurden die Versuchstiere durch eine letale Dosis Diethylether getötet und anschließend das Gewebe mit PBS oder 4 % Paraformaldehydlösung perfundiert.

4.2.1.1 Gewebegewinnung

Zur Durchführung der Perfusion wurde der Brustraum der Ratten geöffnet und eine Perfusionskanüle über die linke Herzkammer in die Aorta vorgeschoben. Zur Druckentlastung wurde das rechte Herzohr eröffnet. Die Perfusion des Gehirns erfolgte mit ca. 200 ml der oben genannten Flüssigkeiten. Im Anschluss an die Perfusion wurden die Gehirne durch Dekapitation und Präparation entnommen.

Für die spätere RNA-Isolation wurden die mit PBS perfundierten Hirne ohne Formalin-Fixierung entweder in RNAlater™ aufbewahrt oder sofort mit RLT-Puffer lysiert. Für die weitere immunhistochemische Untersuchung wurden die mit Paraformaldehydlösung perfundierten Hirne in derselben Lösung bei 4°C aufbewahrt.

Für topografische Untersuchungen und die Co-Lokalisations-Untersuchungen wurden Vibratomschnitte der Rattengehirne mit einem Vibratom (Lancer-101) angefertigt. Mithilfe eines Gewebeklebers wurde das Material auf Halteunterlagen fixiert. Es wurden Frontalschnitte in jeweils fünf Serien angefertigt. Die Schnittdicke betrug 100 µm, sodass die Schnitte innerhalb einer Serie einen Abstand von 400 µm hatten. Die Schnitte wurden bis zur histochemischen Behandlung in einer 0,5 %igen Natriumazid-PBS-Lösung aufbewahrt.

4.2.1.2 Immunhistochemie

4.2.1.2.1 Streptavidin/Biotin-Methode

Die Detektion des CBG-Proteins erfolgte enzymatisch nach der Streptavidin/Biotin-Methode. Bei dieser Technik wird an den spezifischen primären Antikörper ein biotinylierter sekundärer Antikörper gegen Immunglobuline der Spezies, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde, gebunden. Dann wird an diesen Komplex Avidin mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Avidin zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu Biotin aus, was zu einer Verstärkung des Farbsignals führt. Unter Zugabe von Wasserstoffperoxid, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Nickel-Ionen kommt es zu einer schwarzen Färbung des Komplexes. Bei dieser Reaktion fällt das DAB in Anwesenheit von Ni^{2+} schwarz aus. (Abbildung 4.2-1). Zum Färben der Zellen wurde das *R.T.U. Vectastain Kit* (Vector) verwendet.

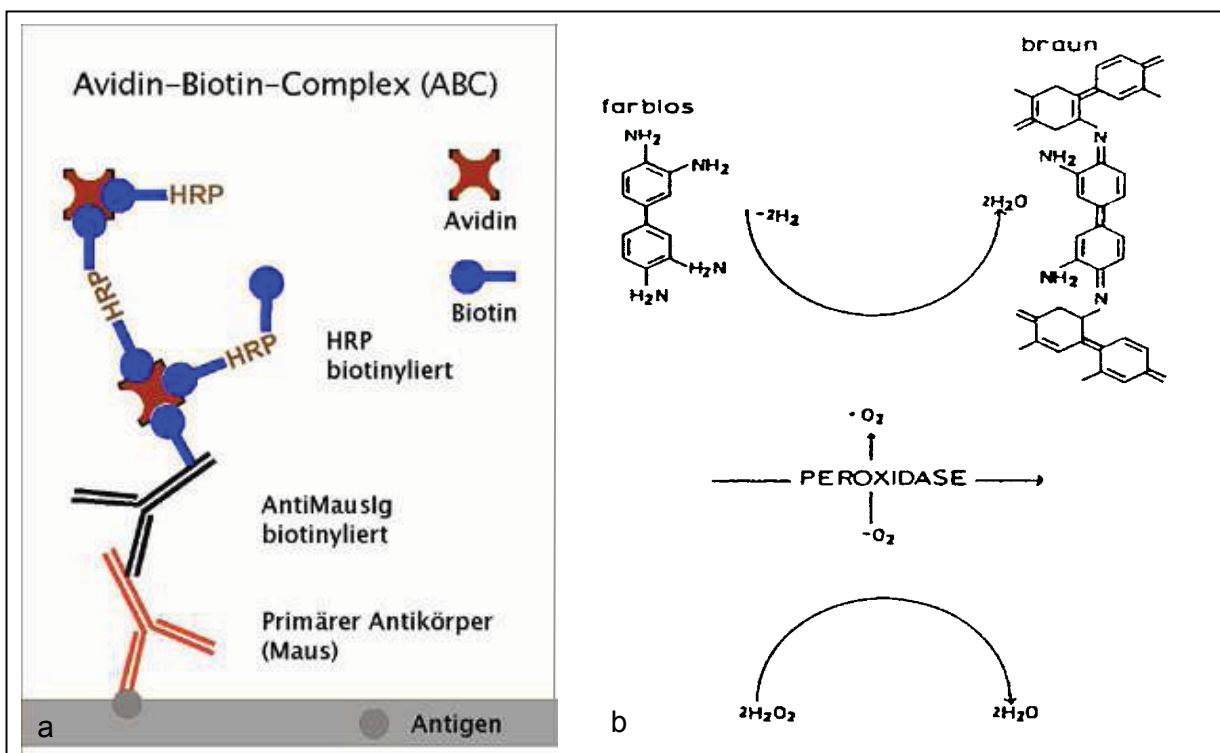


Abbildung 4.2-1 a) Streptavidin/Biotin-Methode. b) Die DAB-Reaktion.

Material und Methoden

Zur immunzytochemischen Charakterisierung der verwendeten Rattenhirnschnitte wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend durch aufeinanderfolgende, jeweils zweiminütige Behandlungen mit 50 %igem, 70 %igem und 100 %igem Ethanol fixiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 1 h mit 1,5 % BSA in PBS (BSA/PBS) oder mit 2,5 % *R.T.U. normal horse serum* inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Als Permeabilisierungsschritt wurde eine Inkubation für 20 min in einer Lösung von 0,1 % Triton® X-100 in PBS durchgeführt. Daran schloss sich eine Inkubation mit primären Antikörpern anti-CBG (*mouse* 12G2; USA; 1:250 mit 0,1 %iger BSA-Lösung verdünnt) in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht an. Nach einem Waschschrift erfolgte eine einstündige Inkubation mit Biotin-markierten sekundären Antikörpern (*R.T.U. biotinylated universal antibody antirabbit/mouse (H + L, made in horse)*). Danach wurden die Präparate eine Stunde mit einem Streptavidin-Biotin-Komplex (*Vectostain R. T. U. Elite ABC Reagent*) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle die Detektionsreaktion mit einer frischen DAB-Lösung (zur Herstellung siehe Kap. 4.2.2.2.1). Wenn die gewünschte Farbintensität erreicht war, wurde die Reaktion durch Abspülen des Objektträgers mit *Aqua dest.* beendet. Abschließend wurden die Schnitte mit AquaTex eingedeckelt.

Mit der Digitalkamera DP10 und dem Programm *Olympus DP soft* wurden Bilder aufgenommen. Zur Bestimmung der anatomischen Strukturen wurde der Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson 1986) verwendet.

4.2.1.3 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) unter möglichst RNase-freien Arbeitsbedingungen. Die RNA-Präparation, einschließlich des DNA-Verdau, erfolgte auf Säulen des Kits nach den Angaben des Herstellers. Konzentration und Reinheit der RNA wurden abschließend spektrophotometrisch bestimmt und mit Gelelektrophorese (1 % Agarose) überprüft.

4.2.1.4 cDNA-Synthese

Zur Vorbereitung der cDNA-Synthese wurden 1 – 5 µg der isolierten Gesamt-RNA mit 1 µl einer Mischung aus je 50 pmol pN(6)- und dT(24)VN-Primern durch Pipettieren gemischt und der Ansatz mit *Aqua dest.* auf 12 µl aufgefüllt. Die Mischung wurde für 10 min bei 70°C inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA zu zerstören. Anschließend wurden die Proben für 2 – 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 2 bzw. 4 µl 5x *First Strand Buffer*, 1 bzw. 2 µl 0,1 M DTT, 0,5 bzw. 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 0,2 µl RNA-Inhibitor und 1 µl 200 U Reverse Transkriptase (*Superscript II™* oder *Superscript III™*) dazugegeben. Die Probe wurde vermischt und für 60 min bei 42°C inkubiert (Personal Cycler, Biometra). Abschließend wurden die Proben für 15 min auf 80°C erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren und die Reaktion zu stoppen. Die Proben wurden dann zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

4.2.1.5 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur *In-Vitro*-Vermehrung (*Amplifikation*) definierter DNA-Abschnitte mithilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Sie erlaubt einen schnellen Nachweis kleinster Mengen von DNA oder RNA.

Mittels PCR wurde die cDNA aus dem vorherigen Arbeitsgang (Kap. 4.2.1.4) amplifiziert. Hierfür wurden 2 µl 10x PCR-Puffer, 0,3 µl dNTP-Mix, 1,5 µl Primer-Mix (für hCBG, GR α, GR β und βActin), 0,2 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 *units*/µl), 0,2 µl cDNA und 15,8 µl *Aqua dest.* unter Kühlung gemischt (Gesamtvolumen: 20 µl).

Die Ansätze wurden anschließend im Mastercycler (Eppendorf) nach dem entsprechenden Temperatur-Programm inkubiert (Tabelle 4.2-1).

Die Primersequenzen (Kap. 4.1.9) wurden so gewählt, dass sie den Genabschnitt, der das gesuchte Protein kodiert, umspannen.

<p>hCBG (538 bp)</p> <p>95°C 2'</p> <p>94°C 12'' } 30x</p> <p>56°C 15'' }</p> <p>72°C 20'' }</p> <p>72°C 10'</p> <p>4°C ∞</p>	<p>BamHI-hCBG_PstI (1376 bp)</p> <p>95°C 2'</p> <p>94°C 30'' } 30x</p> <p>55°C 40'' }</p> <p>72°C 45'' }</p> <p>72°C 10'</p> <p>4°C ∞</p>	<p>rCBG (302 bp)</p> <p>95°C 2'</p> <p>94°C 12'' } 30x</p> <p>56°C 15'' }</p> <p>72°C 20'' }</p> <p>72°C 10'</p> <p>4°C ∞</p>
<p>hGR α</p> <p>95°C 2'</p> <p>94°C 10'' } 35x</p> <p>55°C 12'' }</p> <p>72°C 25'' }</p> <p>72°C 10'</p> <p>4°C ∞</p>	<p>hGRβ</p> <p>95°C 2'</p> <p>94°C 12'' } 30x</p> <p>54°C 15'' }</p> <p>72°C 20'' }</p> <p>72°C 10'</p> <p>4°C ∞</p>	<p>rAktin (439 bp)</p> <p>95°C 2'</p> <p>94°C 10'' } 30x</p> <p>58°C 15'' }</p> <p>72°C 25'' }</p> <p>72°C 10'</p> <p>4°C ∞</p>
<p>Clal-hCBG_EcoRI (1236 bp)</p> <p>95°C 2'</p> <p>194°C 30'' } 25x</p> <p>55°C 30'' }</p> <p>72°C 45'' }</p> <p>72°C 10'</p> <p>4°C ∞</p>		

Tabelle 4.2-1 Temperatur-Programme für RT-PCR-Bestimmungen verschiedener Gene.

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde die DNA gelelektrophoretisch (1 % Agarose, Zusatz von Ethidiumbromid) aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert. Abschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

4.2.2 Zellkultur

4.2.2.1 Kultivierungsbedingungen

Die Zellen der zu untersuchenden Zelllinien wurden entweder auf sterilen Deckgläschen oder in 12well-MTPs kultiviert. Die Leberkarzinom-Zelllinie HepG2, die bekanntermaßen CBG exprimiert, diente als Kontrollsystem. Nach 20-stündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen durch Wechsel zu serumfreiem Medium in ihrem Wachstum synchronisiert. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht wurden die Hälfte der Zellen 1 h vor der Behandlung mit dem Glucocorticoidrezeptor-Antagonisten 0,1µM Mifepriston (RU 486) vorinkubiert.

Im ersten Experiment wurden die Zellen der 12well-MTPs mit vier verschiedenen Hydrocortison-Konzentrationen (0,5µg/ml; 0,25µg/ml; 0,1µg/ml; 0,03µg/ml) allein oder in Kombination mit jeweils 0,1µM RU 486 behandelt. Bei Mifepriston (RU 486) handelt es sich um einen synthetischen Glucocorticoidrezeptor-Antagonisten, der kovalent an den nukleären GR bindet und somit die Wirkung von Glucocorticoiden permanent blockiert. Als Kontrollen dienten Medien mit Zusätzen von 0,5% Ethanol bzw. 0,1µM RU 486, um herauszufinden, ob diese Stoffe einen Einfluss auf die Zellkultur ausüben. Anschließend wurden die Platten bei 37°C und 5% CO₂ für 4, 12, 24 und 36h inkubiert. Nach jedem Zeitpunkt wurden die Überstände der einzelnen wells zur anschließenden Durchführung eines Sekretions-Dot-Blots abgenommen, lyophilisiert, anschließend in 100µl *Aqua dest* aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Die Zellen wurden in der entsprechenden Pufferlösung entweder für die RNA-Isolation nach dem Abschaben lysiert oder für die immunhistochemische Untersuchungen fixiert.

Im zweiten Versuchsteil wurden die auf Deckgläschen kultivierten Gliomzellen mit drei verschiedenen Hydrocortison-Konzentrationen (0,5µg/ml; 0,25µg/ml; 0,1µg/ml) allein oder in Kombination mit 0,1µM RU 486 sowie mit drei verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen (50nM, 25nM, 10nM) allein oder in Kombination mit 0,1µM RU 486 für 5h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und in Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert. Die Zellen hingegen wurden für die immunhistochemischen Untersuchungen fixiert.

4.2.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Für die immunhistochemischen Untersuchungen der Tumorzellen wurden die Zellen wie unter 4.1.7 beschrieben kultiviert. Zur immunzytochemischen Charakterisierung der verwendeten Tumorzellkulturen HepG2 und 1321N1 wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend durch aufeinanderfolgende, jeweils zweiminütige Behandlungen mit 50 %igem, 70 %igem und 100 %igem Ethanol fixiert. Die nach der Färbung aufgenommenen Bilder wurden mit dem Programm *Adobe Photoshop CS* bearbeitet. Bei Fluoreszenzaufnahmen wurde die gefärbte Ebene ausgeschnitten und über eine lichtmikroskopische Aufnahme gelegt.

4.2.2.2.1 Streptavidin/Biotin-Methode

Zur intrazellulären Detektion von CBG oder GRs wurde das *R.T.U. Vectastain Kit* (Vector) wie unter 4.2.1.2.1 beschrieben verwendet.

Als primärer Antikörper wurde in diesem Experiment entweder anti-CBG (*mouse* 12G2; USA; 1:250 mit 0,1 %iger BSA-Lösung verdünnt) oder anti-GR (*rabbit, monoclonal*; 1:500 mit 0,1 %iger BSA-Lösung verdünnt) verwendet.

4.2.2.2.2 Indirekte-Immunfluoreszenz-Methode

Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz lässt sich wie folgt darstellen: Der erste AK bindet spezifisch an das gesuchte Protein, anschließend bindet der zweite mit Cy3 markierte AK spezifisch an das Immunglobulin des primären AK und ermöglicht so dessen Detektion (Abbildung 4.2-2). Cy3 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 550 nm zur Emission roten Lichts ($\lambda = 570$ nm) angeregt und so unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird.

Die fixierten Zellen wurden mit 5 %iger BSA-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der primären Antikörper anti-CBG (*mouse* 12G2; USA; 1: 250 mit 0,1 %iger BSA-Lösung verdünnt) oder anti-GR (*rabbit, monoclonal*; 1:500 mit 0,1 %iger BSA-Lösung verdünnt), gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Für die Detektion wurden die Zellen nach einem Waschschrift in PBS für 1 h mit Cy3-konjugierten

sekundären Antikörpern (*anti-rabbit* oder *anti-mouse*, 1:250 mit 0,1 %iger BSA-Lösung verdünnt) inkubiert. In den folgenden Arbeitsschritten musste schnell und möglichst unter Lichtschutz gearbeitet werden, um eine zu starke Abschwächung der Fluoreszenz von Cy3 zu vermeiden. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit Aqua Tex eingedeckelt und sofort unter einem Auflichtfluoreszenzmikroskop (Olympus BX 50 Fotomikroskop) mit der Filterkombination WU untersucht. Mit der Digitalkamera DP10 und dem Programm *Olympus DP soft* wurden Bilder aufgenommen.

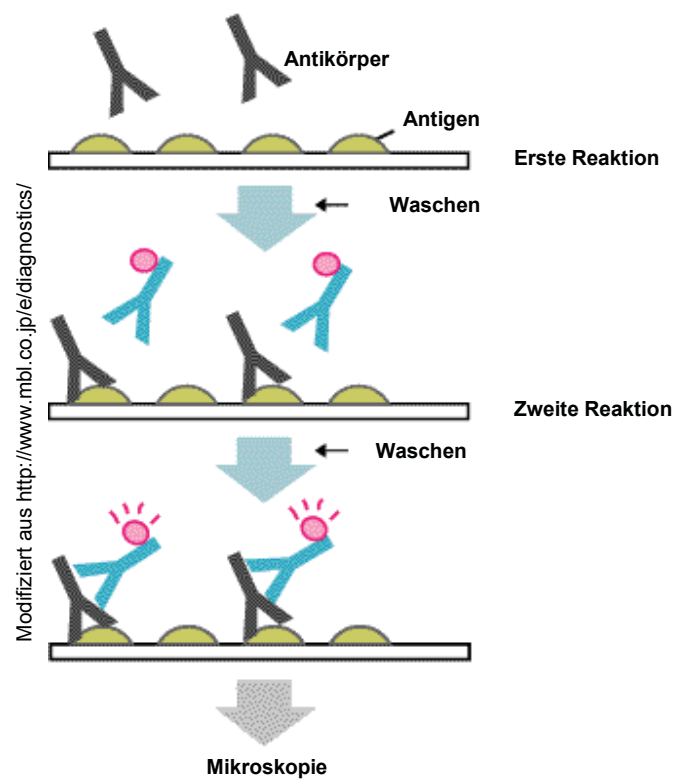


Abbildung 4.2-2 : Indirekte-Immunfluoreszenz-Methode.

4.2.2.2.3 Doppelimmunfärbung

Für die Co-Lokalisations-Experimente wurden die Kulturen, wie oben beschrieben, mit der Streptavidin/Biotin-Methode und der indirekten Cy3-Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Nach der Farbentwicklung der DAB-Färbung und einem Waschschrift wurde die Indirekte-Immunfluoreszenz-Methode durchgeführt. Bei dieser Doppel-färbung musste insbesondere darauf geachtet werden, dass die zwei primären AK aus unterschiedlichen Spezies stammen. Anschließend wurden die Zellen mit Aqua Tex eingedeckelt und sofort unter einem Auflichtfluoreszenzmikroskop (Olympus BX 50 Fotomikroskop) mit der Filterkombination WU untersucht. Mit der Digitalkamera DP10 und dem Programm *Olympus DP soft* wurden Bilder aufgenommen.

4.2.2.3 RNA-Isolation

Die Zellen der Zelllinien A172, U373, SNB19, DBTRG, LN405, 1321N1 und HepG2 wurden für dieses Experiment wie unter 4.1.7 dargestellt kultiviert. Je nach Anzahl wurden die Gliomzellen unter Zugabe von 350 oder 600µl RLT-Puffer lysiert. Nach Homogenisierung der Zellen erfolgte die RNA-Isolation wie im Kap. 4.2.1.3 erläutert.

4.2.2.4 cDNA-Synthese

Die cDNAs der Proben wurden mit der in Kap. 4.2.1.4 beschriebenen Methode hergestellt.

4.2.2.5 RT-PCR

Die RT-PCR wurde von den Proben für hActin, GR α & β und hCBG wie in Kap. 4.2.1.5 beschrieben durchgeführt.

4.2.2.6 Klonierung von DNA Fragmenten und Vektoren

Die Planung der Klonierungen erfolgte mit dem Programm Clone Manager (Sci Ed Central).

4.2.2.6.1 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Um die DNA-Fragmente aus den Agarose-Gelen aufzureinigen zu können, wurden die DNA-Banden der gewünschten Größe mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte nach einem Restriktionsverdau unter Verwendung des *Gel Extraction Kit* (Biozym) nach den Angaben des Herstellers. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden anschließend in H₂O suspendiert.

4.2.2.6.2 Restriktionsverdau von DNA

Die Durchführung des Restriktionsverdaus erfolgte nach molekularbiologischer Standardmethode. Enzym- und Puffermengen sowie Reaktionstemperatur wurden nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas, NEB) gewählt.

4.2.2.6.3 Ligation

Für die Ligation wurde ein typisches Mengenverhältnis von Insert zu Vektor von 1:3 gewählt. Die Ligation erfolgte für 2 – 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Klonierung im pGEM-Teasy[®]-Vektor:

Die PCR-Produkte wurden nach der Aufreinigung (Kap. 4.2.2.6.1) direkt über die *TA-Klonierung* mit dem *pGEM-Teasy[®]*-Vektor (Promega) nach Anweisung des Herstellers ligiert.

Subklonierung im pIRES-EGFP-Vektor:

Die Subklonierung erfolgte über die Herstellung sog. *sticky ends* durch Restriktion der PCR-Produkte im *pIRES*-Vektor mit einem passenden Restriktase-Mix.

4.2.2.6.4 Transformation

Die Hitzeschocktransformationen wurden nach Sambrook and Russell (2001) durchgeführt. Die Identifizierung der erwünschten Kolonien erfolgte durch die sog. „Blau-Weiß“-Selektion auf den LB_{amp+xGAL} Agar-Platten.

4.2.2.6.5 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräp)

3 ml LB_{amp}-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C mit einer Frequenz von 200 U/min geschüttelt. 1,5 ml der Bakterienkultur wurden für 5 min bei 5.000 g und 4°C zentrifugiert und in 120 µl kaltem Puffer I resuspendiert. Dann wurden 150 µl Puffer II zugegeben und mit der Suspension gemischt. Nach einer kurzen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 150 µl Puffer III zugegeben, gemischt und für 10 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA mithilfe von Isopropanol gefällt und nach Waschen mit Ethanol in 20 – 30 µl H₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

4.2.2.6.6 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Die Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten (IRD 700 oder IRD 800) T7- oder SP6-Sequenzierprimern wurde mithilfe des *CycleReader Auto DNA Sequencing Kit* (Fermentas) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der abschließend gestoppte Reaktionsmix wurde auf ein 6 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (LI-COR 4000, MWG-Biotech, München) analysiert.

4.2.2.7 Transfektion und transiente Überexpression der CBG in glialen Zellen

Kationische Lipide werden verwendet, um DNA in künstliche Membranvesikel (Liposomen) einzuschließen. Die resultierenden stabilen kationischen Komplexe binden an und fusionieren mit der negativ geladenen Zellmembran. Die DNA wird dann ins Zellinnere abgegeben.

Für die Lipid-vermittelte Transfektion wurde das Transfektionsreagenz *Effectene* (Qiagen) gewählt und nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Transfektion von Glioblastom-Zellen A172 mit *pIRES-EGFP*-Plasmiden erfolgte in 6well-Platten. Pro well wurden 2×10^5 Zellen ausgesät und nach 24 h in 3 ml Wachstumsmedium transferiert. Um eine ausreichende Transfektionsrate zu erreichen, wurden vier

verschiedene Optimierungsversuche nach dem unten stehenden Schema (Tabelle 4.2-2) durchgeführt:

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
DNA, µg	0,3	0,2	0,3	0,3
Enhancer, µl	2,4	1,6	2,4	2,4
Effectenereagenz, µl	6	6	5	10
Puffer EC, µl	75	75	75	75
Wachstumsmedium, ml	<i>ad 400 µl</i>			

Tabelle 4.2-2 Transfektionsschema

Die Erfolgsrate der Transfektion wurde am nächsten Tag anhand der Fluoreszenz EGFP-transfizierter Zellen unter dem Axiovert 25 Mikroskop überprüft.

4.2.2.8 Proteinanalyse

4.2.2.8.1 Immunpräzipitation

Zuerst wurde der CBG-Antikörper an Agarose-*Beads* gekoppelt. Dazu wurden 5 µl anti-CBG-Antikörper (polyklonal, Affiland) mit 25 µl Protein-G-Agarose (Boehringer, Mannheim) in 500 µl IP-Lysispuffer für 30 min bei 4°C über Kopf rotierend vorinkubiert, um den Antikörper mit seinem Fc-Teil an die Protein-G-Agarose zu binden.

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Je 75 cm² wurden 1.000 µl IP-Lysispuffer zugegeben und die Zelllysate wurden in Reaktionsgefäßen gesammelt. Nicht gelöste Zellbestandteile wurden durch eine Zentrifugation bei 15.000 g bei 4°C für 10 min abgetrennt. Der erhaltene, klare Überstand wurde mit den G-Protein-gekoppelten anti-CBG-Antikörpern immunpräzipitiert. Der Antikörper/Protein-G-Agarose-Komplex wurde durch Zentrifugation bei 2.000 g für 1 min pelletiert und das Pellet fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Die Agarosemischung wurde zweimal in Laemmli-Puffer resuspendiert, indem die Probe für 3 min auf 95°C erhitzt und der Überstand nach kurzem Zentrifugieren in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde.

4.2.2.8.2 Dialyse von Immunpräzipitaten

Die Immunpräzipitate der Zelllinien 1321N1, HepG2, U373 und A172 wurden mithilfe eines Dialyseverfahrens gereinigt. Dafür wurden die Proben in einen Dialyseschlauch gefüllt und für 48 h bei 4°C in 5 l *Aqua dest.* gerührt. Nach 24 h wurde das komplette Wasser gewechselt.

4.2.2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgt hierbei nach ihrer molekularen Masse (Laemmli, 1970). Die Proteinlösung wurde entweder in einem 12 %igen SDS-Gel oder einem 6 %igen Sammelgel in der Mini-PROTEAN Apparatur (BioRad) mit einem Laufpuffer

bei 60 – 110 V aufgetrennt. Nach dem Auftrennen wurde das Gel mit Coomassie-Blau (1) oder Silbernitrat (2) gefärbt.

(1) Das Gel wurde 30 min in Coomassie-Lösung gefärbt und überschüssiger Farbstoff anschließend in H₂O ausgewaschen.

(2) Das Gel wurde für 6 min in 50 %igem Methanol mit 5 %iger Essigsäure fixiert, dann 10 min in 0,1 %iger Silbernitratlösung inkubiert und für weitere 10 min in einer Entwicklungslösung gefärbt. Abschließend wurde das Gel 3 – 4 min mit 5 %iger Essigsäure inkubiert.

4.2.2.8.4 Proteinidentifizierung durch *peptide mass fingerprint* (MALDI)

Beim MALDI-Verfahren (*matrix-assisted laser desorption/ionization*) werden die zu untersuchten Peptide in eine Matrix eingebaut. Als Matrix-Substanzen eignen sich Substanzen, welche die Fähigkeit zur Co-Kristall-Bildung und zum Protonentransfer besitzen. Die Matrix-Moleküle sind in der Lage, Protonen auf die Proteine zu übertragen und diese damit positiv aufzuladen. Die kristallisierten Proteine werden dann unter Hochvakuum mit einem Laser beschossen und dadurch verdunstet. Anschließend werden die positiv geladenen Protein-Ionen im elektrischen Feld beschleunigt. Ihre Fluggeschwindigkeit wird dabei von ihrer Ladung und ihrer Masse bestimmt. Gemessen wird die Zeit, welche die Ionen benötigen, um den Flugzeitanalysator (*time of flight*, TOF) zu durchfliegen.

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden für die MALDI-TOF-Analyse aus dem Gel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und aus dem Gelstück eluiert. Die Probenvorbereitung erfolgte nach dem Protokoll von (Shevchenko et al. 1996). Die ausgeschnittenen Banden wurden je 15 min mit Acetonitril, dann mit Ammoniumhydrogencarbonat und im Anschluss mit Acetonitril überschichtet. Weiter wurden die Gelstücke reduziert, alkyliert und schließlich im Vakuum (SpeedVac) getrocknet. Die getrockneten Gelproben wurden mit einer Trypsin-Lösung bedeckt und für 30 min auf Eis verdaut. Die extrahierten Peptide wurden mit der Matrixlösung im Verhältnis 1:1 gemischt und für die Messung auf einen Protein-Chip aufgetragen.

Die Messung erfolgte mit dem Flugzeitanalysator des Instituts für Biomolekulare Chemie des Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Jena.

4.2.2.9 Bindungsassay und Bindungs-Dot-Blot

Mit dem Bindungsassay sollte untersucht werden, ob das in den Gliomzellen nachgewiesene CBG funktionell aktiv ist.

Der Test funktioniert nach folgendem Prinzip: Ist das gebildete CBG funktionell aktiv, kann es an Cortisol, seinen physiologischen Bindungspartner, spezifisch binden. Das markierte Cortisol kann nun, z. B. mittels einer enzymatischen Detektion sichtbar gemacht werden (Abbildung 4.2-3). Der Assay wurde parallel in zwei verschiedenen Ausführungen, dem Bindungsassay und dem Bindungs-Dot-Blot, etabliert.

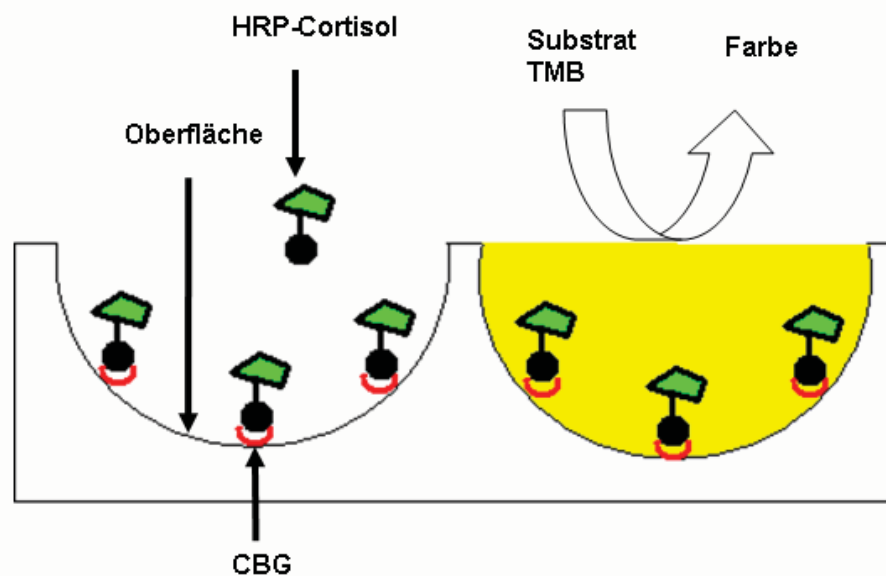


Abbildung 4.2-3 Schema des Bindungsassays.

Für den Bindungsassay wurden die Zelllysate von 1321N1-, HepG2- und U373-Zellen wie in Kap. 4.2.2.8.1 beschrieben hergestellt und die Reagenzien des *Salivary Cortisol ELISA 96 Test* (DRG) verwendet.

Um statistisch gesicherte Daten zu erhalten, wurden die Experimente dreifach durchgeführt. Während einer Inkubation über Nacht bei 4°C erfolgte die Bindung der Proteine, einschließlich CBG, an die Oberflächen der Kavitäten einer 96well-Platte. Als Negativkontrolle IP-Lysispuffer. In dem darauf folgenden Waschschrift wurden alle ungebundenen Proteine abgespült. Nach Zugabe von 200 µl der Cortisol-Lösung lagerte sich das Cortisol spezifisch an sein BG an. Durch die Präinkubation mit unmarkiertem Hydrocortison wurden die potenziell unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 250 µl einer Lösung mit HRP-markiertem Cortisol, welches mit unmarkiertem Cortisol um die Bindung an das CBG konkurriert und es folglich vom CBG verdrängen kann. Mit dem nächsten Waschschrift wurde ungebundenes (markiertes und unmarkiertes) Cortisol abgespült, sodass nur spezifisch gebundenes Cortisol erhalten blieb. Dann wurden 200 µl des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB) (Abbildung 4.2-4) zugegeben, welches durch die HRP unter Blaufärbung umgesetzt wird. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung unterbrochen. Durch die in der Stopplösung enthaltene Schwefelsäure erfolgte ein weiterer Farbumschlag von blau nach gelb. Die spektrophotometrische Bestimmung erfolgte mit dem Spectra max plus (Molecular Devices) unter Verwendung des Programms *soft max Data pro 4.0* bei 450 nm.

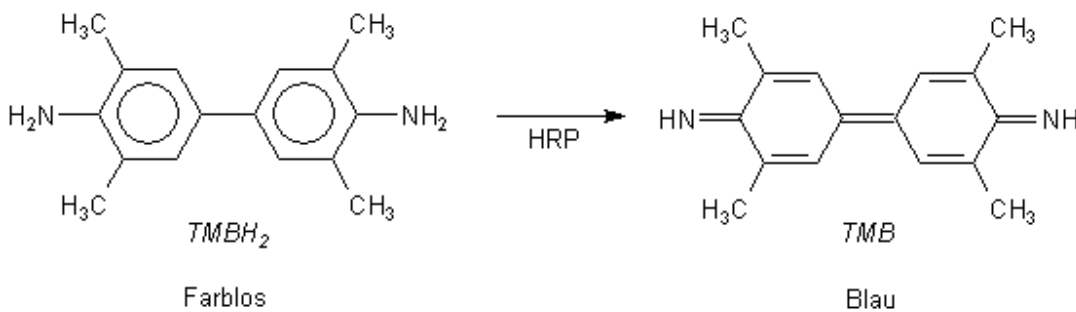


Abbildung 4.2-4 Prinzip der TMB-HRP-Reaktion.

Für den Bindungs-Dot-Blot wurden die nach den Angaben in Kap. 4.2.2.8.1 hergestellten Zelllysate bzw. Immunpräzipitate von 1321N1-, U373-, HepG2- und A172-Zellen verwendet. Es wurden im ersten Schritt zur Proteinbindung 10 µl Lysat/Präzipitat in jede Vertiefung der Cyto-Platte pipettiert. Für eine

Doppelbestimmung wurde jede Probe zweimal aufgetragen. Als Negativkontrolle diente IP-Lysispuffer.

Nach einer Inkubation über Nacht wurden pro Vertiefung 10 µl Cortisol-Lösung zugegeben und die Platten für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absaugen ließ man im nächsten Schritt je 50 µl *Conjugate*-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur einwirken. Das Prinzip gleicht bis hier dem oben beschriebenen. Da es sich beim *Conjugate*-Enzym um an Cortisol gekoppelte HRP handelt, konnte nach Zugabe frischer DAB-Lösung wiederum, wie in Kap. 4.2.1.2.1, die Farbreaktion zur Detektion genutzt werden. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Platten mit *Aqua dest.* abgespült.

Abschließend wurden die Platten mit dem Canon-Scanner und der Software *Cyto 3.5* bearbeitet und ausgewertet.

4.2.2.10 Sekretions-Dot-Blot

Um herauszufinden, ob die Zelllinie 1321N1 das CBG freisetzt und die Sekretion durch die in Kap. 4.2.2.1 beschriebenen Behandlungen mit Hydrocortison, Dexamethason und Mifepriston beeinflusst werden konnte, wurde ein Bindungs-Dot-Blot angewendet.

Für den Sekretions-Dot-Blot wurden die nach den Angaben in Kap. 4.2.2.1 gewonnenen Überstände aus den zwei verschiedenen Experimenten verwendet. In jede Vertiefung der 96well- Flachtiterplatten wurden 10 µl Überstand pipettiert und die Platten eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Jede Probe wurde in einer Drei- oder Vierfach-Bestimmung untersucht. Als Negativkontrolle diente PBS.

Nach dem Absaugen wurden je 10 µl des primären anti-CBG-Antikörpers (*mouse*, 12G2, 1:100 in PBS-TX verdünnt) zugegeben und die Platten über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS-T konnte der zweite Antikörper *anti-mouse* IgG (1:200 in PBS-T verdünnt) für 2 h bei Raumtemperatur einwirken. Nach erneutem Waschen mit PBS-T erfolgte die zweistündige Inkubation mit dem dritten Antikörper *mouse* PAP (1:200 in PBS-T verdünnt). Nach dem Waschen mit PBS-TX wurden 10 ml frische DAB-Lösung auf die Platten gegeben, die

Material und Methoden

5 – 10 min einwirkten. Die Detektionsreaktion des Dot-Blots funktioniert nach dem gleichen Schema wie die in Kap. 4.2.1.2.1 beschriebene Immunfärbung. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Platten mit *Aqua dest.* abgespült.

Abschließend wurden die Platten mit dem Canon-Scanner und der Software *Cyto 3.5* bearbeitet und ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 CBG im Zentralnervensystem der Ratte

5.1.1 Topografie CBG-positiver Zellen im Rattenhirn

Nach der CBG-Immunfärbung zeigten sich teilweise einige der hypothalamischen Neurone des *Nucleus paraventricularis* (NPC, Abbildung 5.1-1b) und des *Nucleus supraopticus* (NSO, Abbildung 5.1-1a), einschließlich des retrochiasmatischen Anteils des *Nucleus supraopticus* (Abbildung 5.1-1d), positiv. Die CBG enthaltenden Zellen waren fast ausschließlich magnozellular und wiesen einen durchschnittlichen Zellkörperdurchmesser von 15 μm auf.

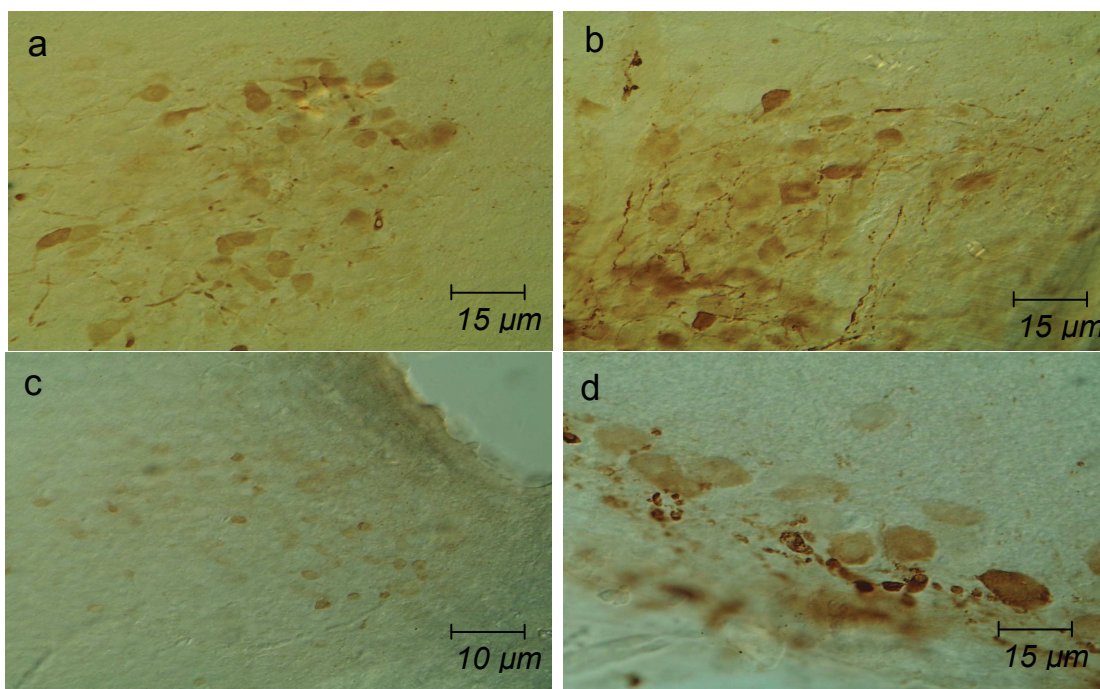


Abbildung 5.1-1 Immunhistochemische CBG-Färbung von magnozellulären Perikaryen und Fortsätzen in NSO (a) und NPV (b). CBG-positive parvozelluläre Neurone in NSC (c). Neurone der retrochiasmatischen Anteile des NSO weisen CBG-positive Perikaryen und stark immunoreaktive axonale Varikositäten auf (d).

Ergebnisse

Die Immunreaktivität war im Allgemeinen jedoch relativ schwach. Die Färbung wirkte granulär und war auf das perinukleäre Zytoplasma begrenzt, während im Zellkern keine spezifische Färbung zu beobachten war. Mehrere varikös erweiterte neuronale Vorsätze zeigten sich immunpositiv (Abbildung 5.1-1a und b), so auch im lateralen Hypothalamus (Abbildung 5.1-2b). Der *Bed nucleus* der *Stria terminalis* (BNST) (Abbildung 5.1-2d) und die *präoptische Region* enthielten kleine CBG-positive Gruppen von magnozellularen Neuronen. Vereinzelt parvozelluläre Neurone des NPV und des *Nucleus suprachiasmaticus* wiesen schwache Immunreaktivität im Zytoplasma auf (Abbildung 5.1-1c). Einzelne magnozelluläre Neurone im NPV und im *Nucleus periventricularis* des Hypothalamus zeigten eine deutliche CBG-Immunreaktivität im Zytoplasma (Abbildung 5.1-2a).

In den CA 2- und CA 3-Regionen des Hippocampus fanden wir viele CBG positive Zellen (Abbildung 5.1-3a). Es färbten sich offensichtlich pyramidale und nicht pyramidale Neurone.

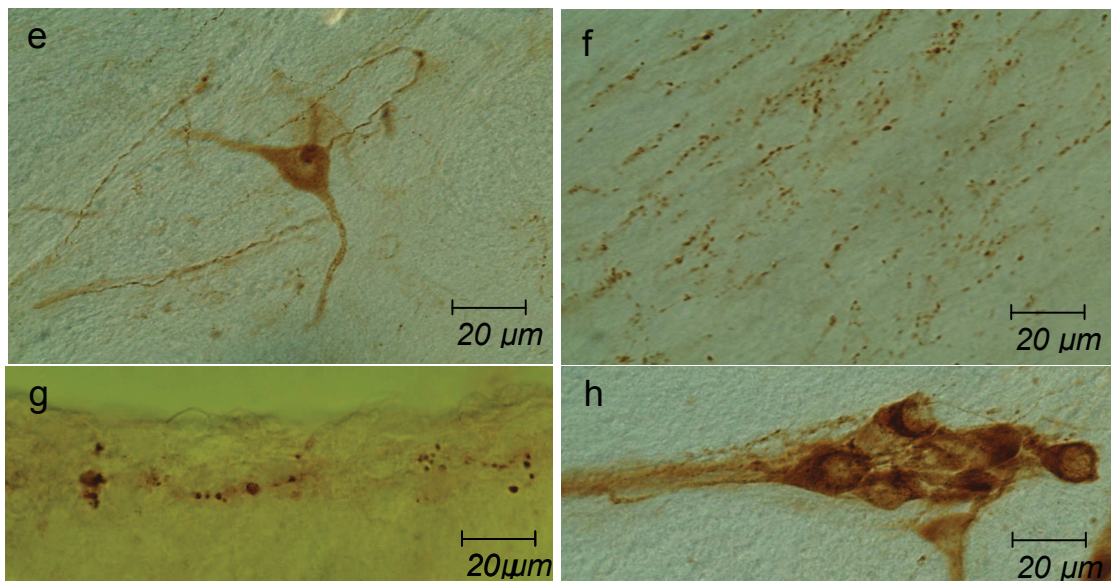


Abbildung 5.1-2 Einzelnes CBG-positives magnozelluläres Neuron im NPV (a). Zahlreiche varikös erweiterte immunpositive neuronale Fortsätze im lateralen Hypothalamus (b). Immunhistochemische CBG-Färbung einzelner Projektionen der internen Schicht der *Eminentia mediana* (c). Kleine Gruppe CBG-immunreaktiver im BNST (d).

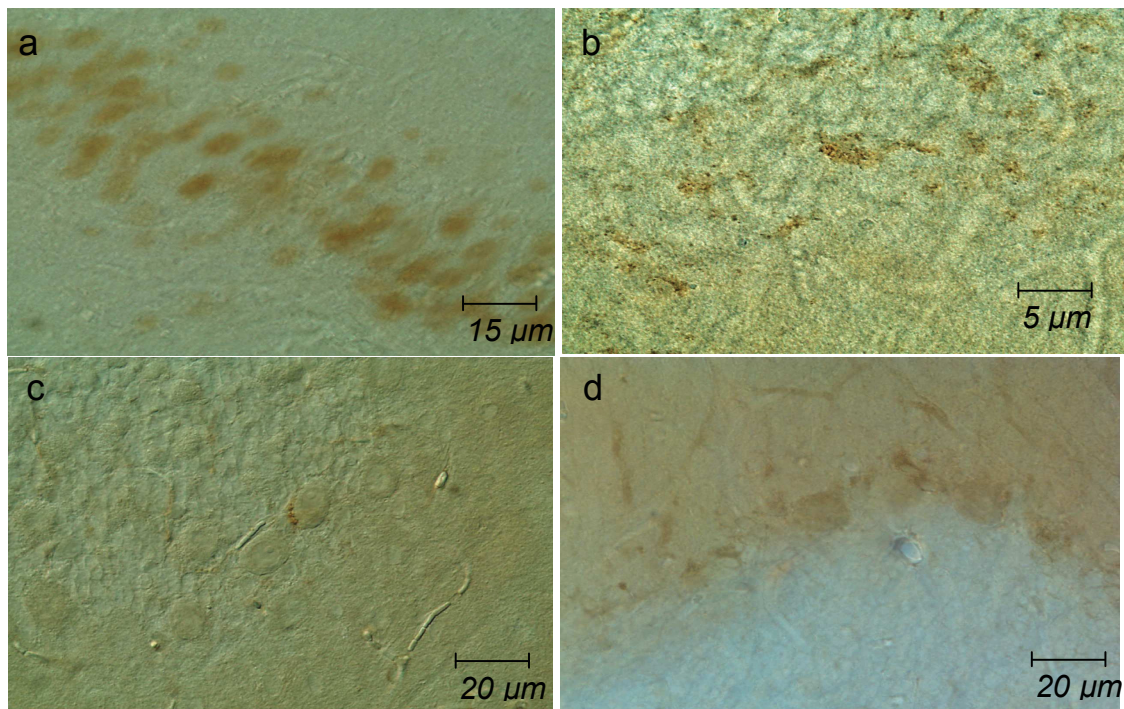


Abbildung 5.1-3 Gruppe immunpositiver Pyramidenneuronen im CA-2-Sektor des Hippocampus (a). Zahlreiche CBG-positive neuronale Fortsätze im *Stratum granulosum* des Kleinhirns (b). Immunhistochemische CBG-Färbung von Perikaryen einzelner Purkinje-Zellen (c und d) und deren in der Molekularschicht verlaufenden Dendriten (d).

In der Kleinhirnrinde konnte ebenfalls eine Reihe CBG-positiver Purkinje-Zellen gefunden werden (Abbildung 5.1-3c und d). In der Körnerzellschicht des Kleinhirns fanden sich viele CBG-positive Fasern, die scheinbar zu den Moosfasern gehören (Abbildung 5.1-3b).

Im Motokortex zeigten sich keine CBG-gefärbten Zellkörper.

Weiter wurden immungefärbte Fasern im Mesencephalon, in der *Substantia grisea centralis* und in der *Medulla oblongata* nachgewiesen. Das Mesencephalon und die *Medulla oblongata* beinhalten verstreute CBG-positive Fasern in der *Substantia grisea centralis* und in der *Formatio reticularis*, während im kompletten Hirnstamm keine immungefärbten Zellkörper gefunden wurden.

Im Rückenmark ließen sich einzelne CBG-gefärbte Zellkörper im Hinterhorn entdecken. In Schnitten des hinteren Hypothalamus konnte CBG-Immunreaktivität in den Varikositäten der inneren und äußeren Schicht der *Eminentia mediana* (EM) entdeckt werden (Abbildung 5.1-2c). In der inneren Schicht der EM zeigte sich CBG-Färbung in Axon-Enden in der Nähe von Blutgefäßen. In den Semi-Dünnschnitten des

Ergebnisse

Hypophysenhinterlappens (HHL) war verstreute Immunfärbung in den Herring-Körpern zu beobachten, während die Pituizyten kein Signal aufwiesen. Ein Teil der endokrinen Zellen des Hypophysenzwischen- (HZL) und -vorderlappens (HVL) war CBG-positiv. Die Kontrollschnitte (ohne primären AK) blieben ungefärbt.

In einzelnen Ependymzellen (Abbildung 5.1-4a) sowie Tanyzyten (Abbildung 5.1-4c, Pfeil) erschien ebenfalls eine spezifische CBG-Färbung. Ein Teil der Epithelzellen des *Plexus choroideus* war auch CBG-positiv (Abbildung 5.1-4b).

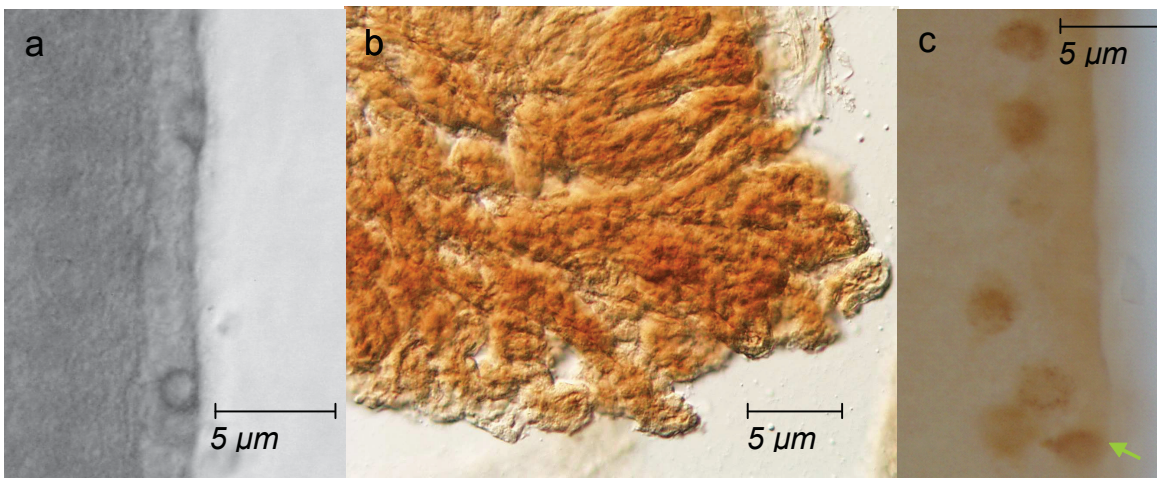


Abbildung 5.1-4 a) Kleine Subpopulation von CBG-positiven Ependymozyten. b) CBG-Färbung des *Plexus choroideus*. c) Intensive Färbung der subependymalen Zellen und Tanyzyten (Pfeil).

5.1.2 RT-PCR

In der RT-PCR der RNA-Extrakte verschiedener Gehirnregionen konnte CBG-mRNA (resp. cDNA) in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die Größe des PCR-Produktes von 300 bp stimmte mit der beim Primer-Design vorausgerechneten Fragmentgröße überein (Abbildung 5.1-5b).

In RT-PCR-Untersuchungen des *Nucl. paraventricularis*, des *Nucl supraopticus*, des *Plexus choroideus* und der *Eminentia mediana* zeigten sich deutlich sichtbare Banden. Außerhalb des Hypothalamus war das stärkste Signal im Hippocampus zu beobachten. Auch im Kleinhirn konnten CBG-Transkripte zweifelsfrei nachgewiesen

Ergebnisse

werden. Im cerebralen Cortex scheint dagegen keine CBG-Bildung stattzufinden. Der Hypophysenvorderlappen und die *Pars intermedia* der Hypophyse zeigten CBG-positive Amplifikationsprodukte, während der Hypophysenhinterlappen kein Signal aufwies.

Die Negativkontrolle (ohne RNA-*Template*) zeigte keine Banden. Ein sehr deutliches Signal konnte hingegen bei RNA aus HepG2-Zellen detektiert werden, die bekanntermaßen CBG exprimieren (Khan et al. 1984, Mhrshahi et al. 2006) und somit als Positivkontrolle verwendet wurden. Die RT-PCR für β -Actin (*housekeeping gene*) lieferte für alle Proben, außer der Negativkontrolle, das erwartete 439 bp große PCR-Produkt.

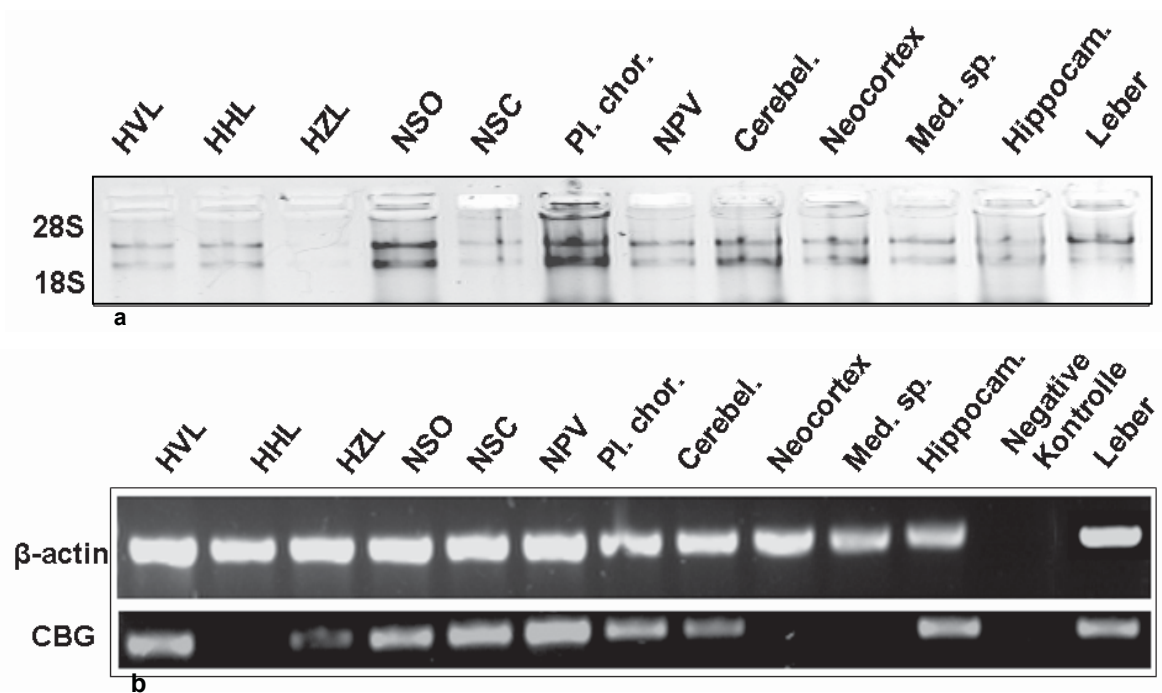


Abbildung 5.1-5 a) Agarose-Gelelektrophorese gRNA. b) PCR-Produkte für β -Actin (439bp) und CBG (302bp).

5.2 CBG in glialen Tumorzelllinien

5.2.1 Immunhistochemische Charakteristik maligner glialer Zellen

Unter dem Mikroskop zeigte sich die Morphologie der Zelllinie 1321N1 wie folgt: Die Zellen wuchsen einzeln und erreichten nach ca. 5 – 7 Tagen den Zustand homogener Konfluenz. Die Einzelzelle hatte meist einen spindelförmigen Zellkörper. Allerdings gab es auch einzelne Zellen, die eher eine runde Form aufwiesen. Bei den runden Zellen handelt es sich wahrscheinlich um junge Zellen, während die Fortsätze der spindelförmigen Zellen im Laufe der Differenzierung entstanden sein dürften. Es gab auch einige Zellen, die mehrere Vorsätze aufwiesen. Im Durchschnitt waren die Zellen 10 µm groß. Der runde Zellkern zeigte sich meist deutlich in der Mitte des Zellkörpers, den er dabei fast bis zur Hälfte ausfüllte. Bei genauerer Betrachtung erschien das Zytoplasma der älteren Zellen granulär.

Mit der Streptavidin/Biotin-Methode wurde eine deutliche Färbung der Zellen erzielt, der Beweis der Anwesenheit des CBG-Proteins. Die Färbung trat ausschließlich perinukleär im Zytoplasma auf und erschien bei höherer Auflösung ebenfalls teilweise granulär (Abbildung 5.2-1a bis d).

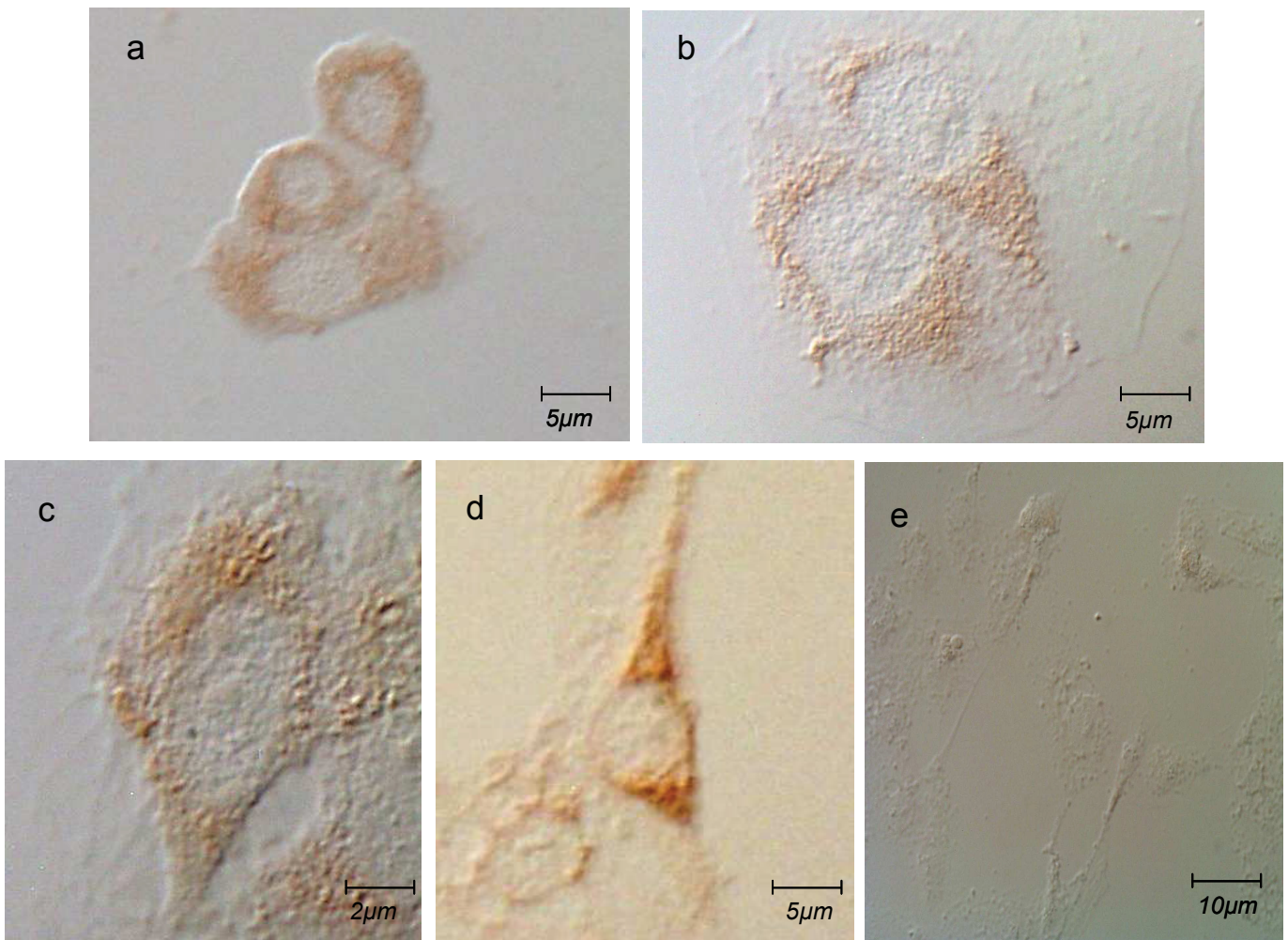


Abbildung 5.2-1 Immunohistochemische diffuse (a) feingranuläre (b, c) perinukleäre (a – d) CBG-Färbung (braun) der Perikaryen der 1321N1-Zellen und grobschollige Färbung der Fortsätze der differenzierten Zellen (d). Negativkontrolle (e).

Im zweiten Schritt wurde versucht, Glucocorticoidrezeptoren in den 1321N1-Zellen zu detektieren. Dabei kamen beide immunhistochemischen Methoden, die Streptavidin/Biotin-Methode und die indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit Cy3, zum Einsatz (siehe Kap. 4.2.2.2).

Nach der Durchführung der Streptavidin/Biotin-Methode (4.2.1.2.1) war im Mikroskop eine deutliche braune Färbung der Zellkerne zu erkennen. Allerdings zeigten einige der Zellen zusätzlich auch im Zytoplasma eine GR-Färbung. Ebenfalls war bei

manchen Zellen eine Färbung sowohl des Kerns als auch des Plasmas sichtbar (Abbildung 5.2-2).

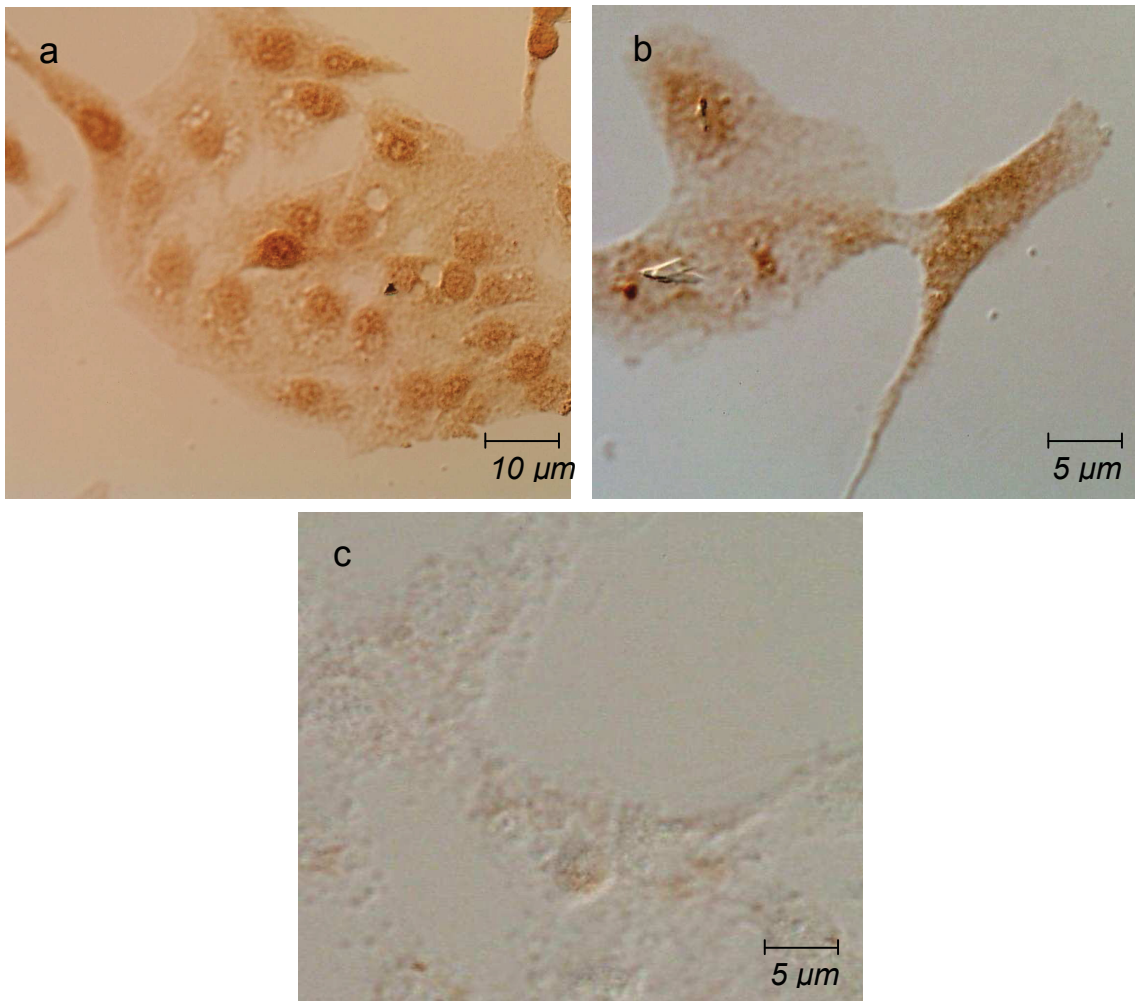


Abbildung 5.2-2 Inhomogene Immunfärbung mit DAB (braun) für GR in der Zellpopulation von 1321N1-Zellen (a, b). Nur einige Zellen weisen eine starke nukleäre Reaktion auf (a). Wenige Zellen mit zytoplasmatischer Färbung (b). Negativkontrolle (c).

Um die unspezifische Hintergrundfärbung der DAB-Färbung zu umgehen, wurde die indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit Cy3 angewendet. Man konnte, wie bei der DAB-Methode, ebenfalls eine Anfärbung der meisten Zellkerne erkennen (Abbildung 5.2-3). Hingegen war mit dieser empfindlicheren Methode im Zytoplasma fast keine Färbung zu erkennen. Interessanterweise konnte jedoch nicht bei allen Zellen die gleiche Anfärbungsintensität erzielt werden. Zudem konnte nicht in allen GR detektiert werden.

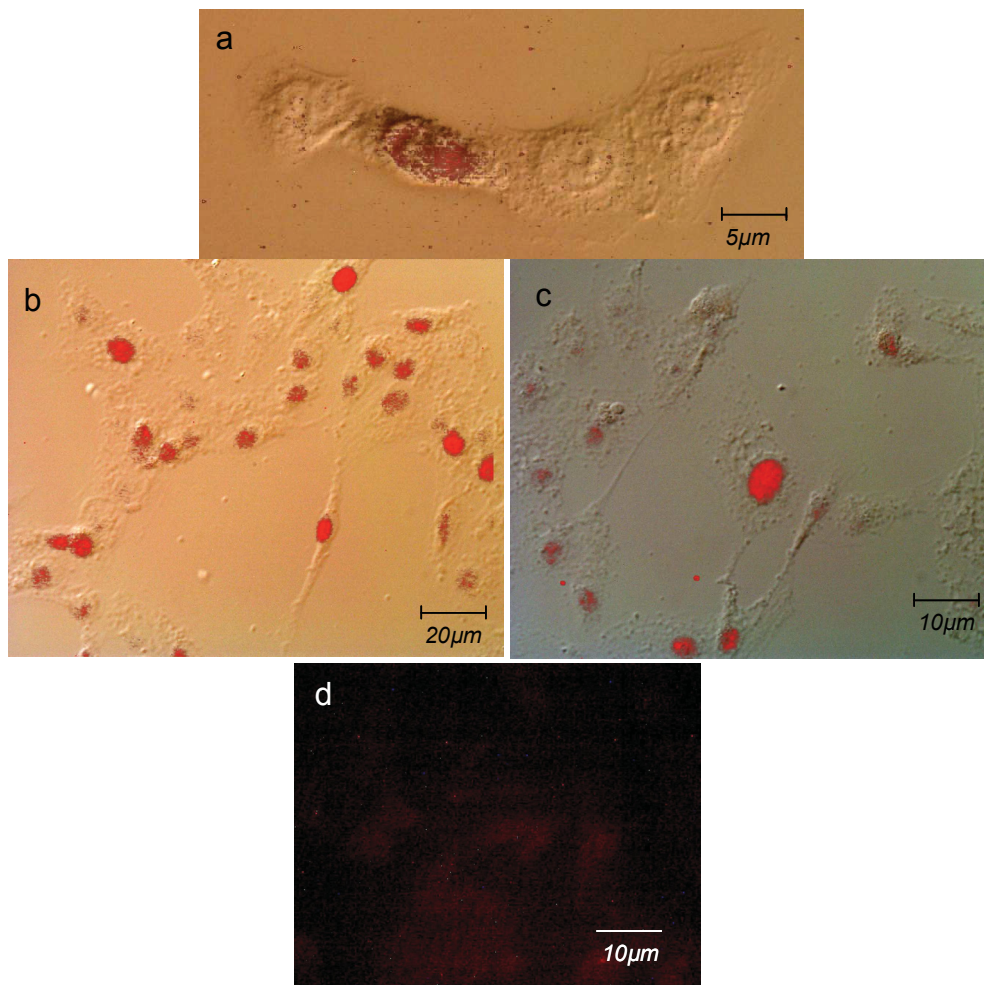


Abbildung 5.2-3 Indirekte Immunofluoreszenzmarkierung für GR 321N1-Zellen mit Cy3 (rot). Die Zellpopulation weist eine Inhomogenität (a, c) für Anfärbbarkeit und Intensität (b, c) der Markierung auf. Nicht jede Zelle exprimiert die GRs (a). Negativkontrolle (d).

Co-Lokalisation in der Immunfluoreszenz

Im ersten Schritt erfolgte die Streptavidin/Biotin-Färbung, danach erst die Cy3-Färbung, da letztere Methode empfindlicher als die DAB-Färbung ist, das Reaktionsprodukt jedoch instabiler, wodurch die Farbintensität schneller abnimmt.

In diesem Experiment war, wie in den Färbungen zuvor, deutlich zu erkennen, dass CBG in der Zelllinie 1321N1 vorhanden ist. Ebenso erschien das spezifische Reaktionsprodukt granulär im Zytoplasma. Weiter war zu beobachten, dass die Zellen nur teilweise den GR im Kern exprimieren. Nicht jede Zelle wies eine GR-Färbung auf, aber fast jede Zelle war positiv für CBG (Abbildung 5.2-4 und Abbildung 5.2-5).

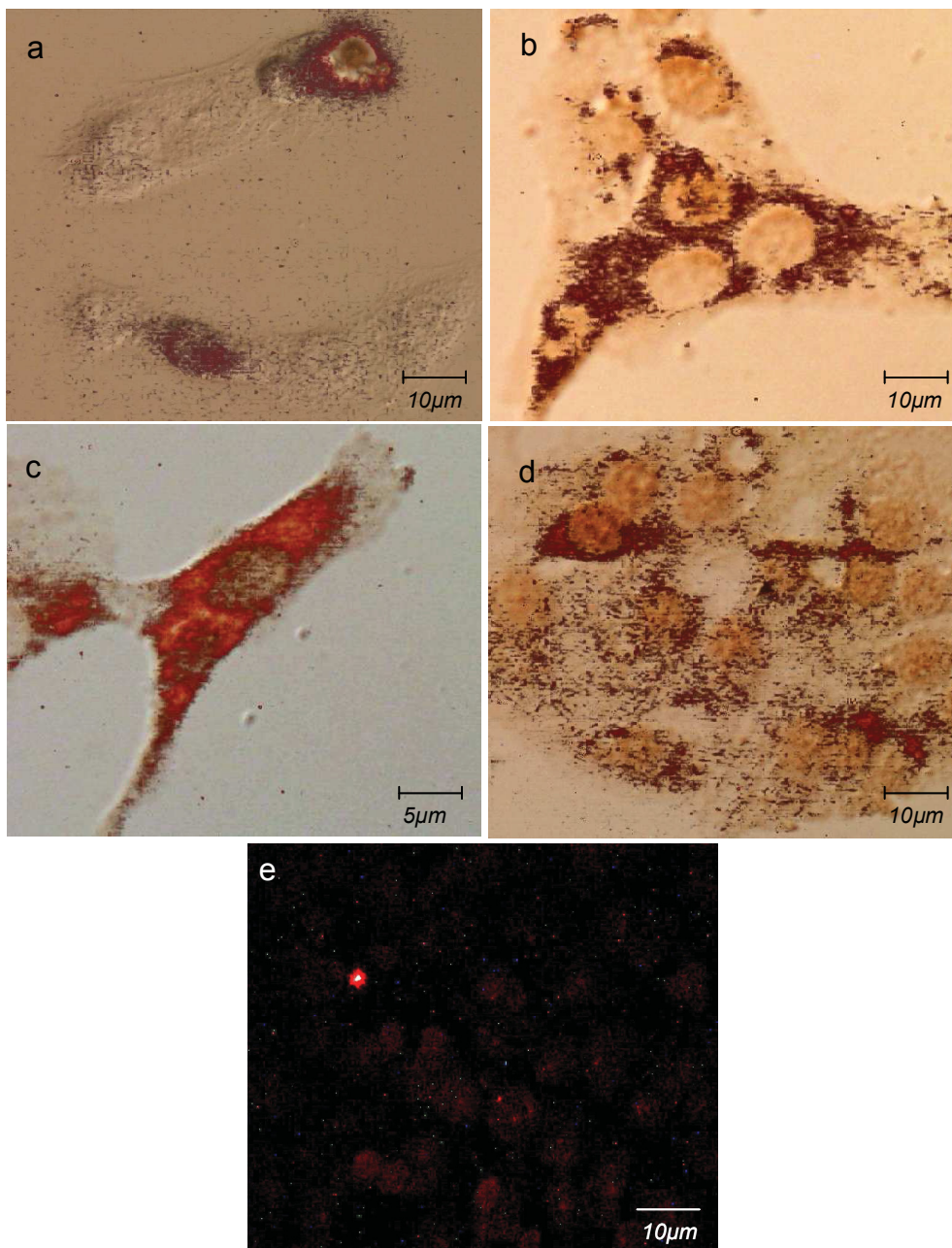


Abbildung 5.2-4 Doppelimmunfärbung der 1321N1-Zellen (DAB (braun) für GR und indirekter Cy3-Immunfluoreszenzmarkierung (rot) für CBG). Die GR-Färbung zeigt sich deutlich nukleär (a, b, d) und inhomogen (b, d). Die CBG-Immunmarkierung zeigt sich feingranulär und perinukleär (a - d). Negativkontrolle für die Immunfluoreszenzmarkierung von CBG (e).

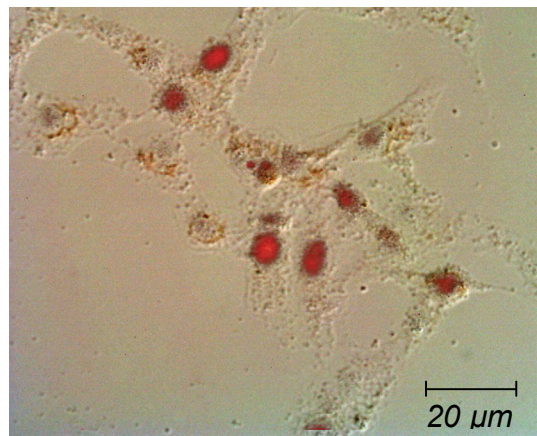


Abbildung 5.2-5 1321N1-Zellpopulation mit DAB-Färbung (braun) für CBG und indirekter Cy3-Immunfluoreszenzmarkierung (rot) für GR. Die GRs sind unterschiedlich intensiv nukleär angefärbt. Nicht alle Zellen sind positiv für GR. Das CBG zeigt sich perinukleär.

Die Zellen der Zelllinie HepG2 (Positivkontrolle) zeigten sich im Mikroskop als einzeln wachsende Zellen, die homogene Konfluenz nach etwa fünf Tagen erreichten. HepG2-Zellen erschienen meist rund, es ließen sich jedoch auch einige Zellen mit bis zu drei kurzen Ausläufern erkennen. Der Zellkern hatte eine runde Form und füllte fast das gesamte Zytoplasma aus. Bei stärkerer Vergrößerung waren im Zytoplasma Granula zu erkennen.

Der immunhistologische Nachweis von CBG in HepG2-Zellen erfolgte mit der indirekten Immunfluoreszenz. Der Farbstoff Cy2 leuchtete nach der Anregung mit Licht der Wellenlänge 490 nm grün auf. Das Protein war fast ausschließlich im perinukleären Zytoplasma der Zelle zu finden (Abbildung 5.2-6).

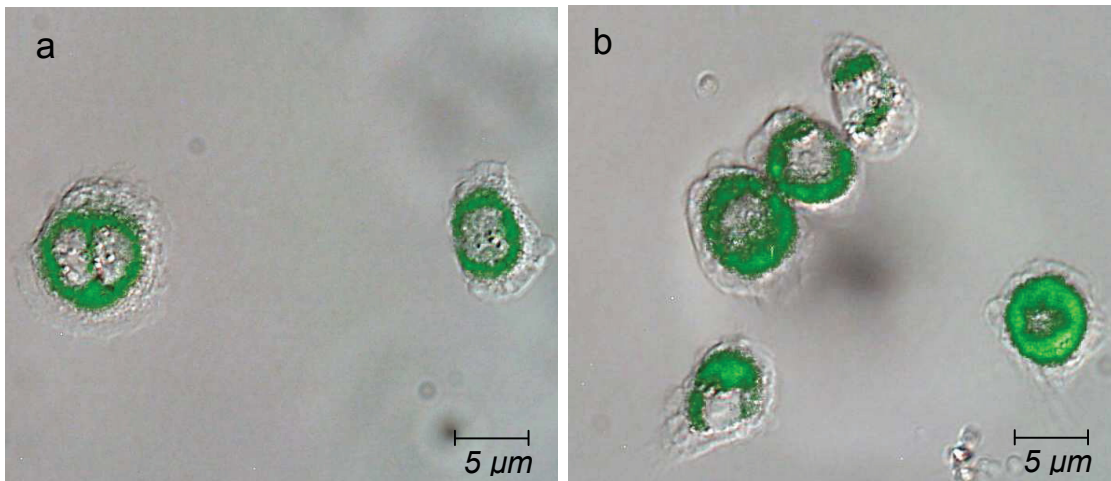


Abbildung 5.2-6 Immunhistochemische perinukleäre CBG-Färbung (grün) der Perikaryen der HepG2-Zellen (a und b).

Um die Glucocorticoidrezeptoren in den Leberkarzinomzellen sichtbar zu machen, kam die indirekte Immunfluoreszenz mit Cy3 zur Anwendung. Auch hier waren die GR-Proteine bei fast allen Zellen ausschließlich im Zellkern nachweisbar (Abbildung 5.2-7).

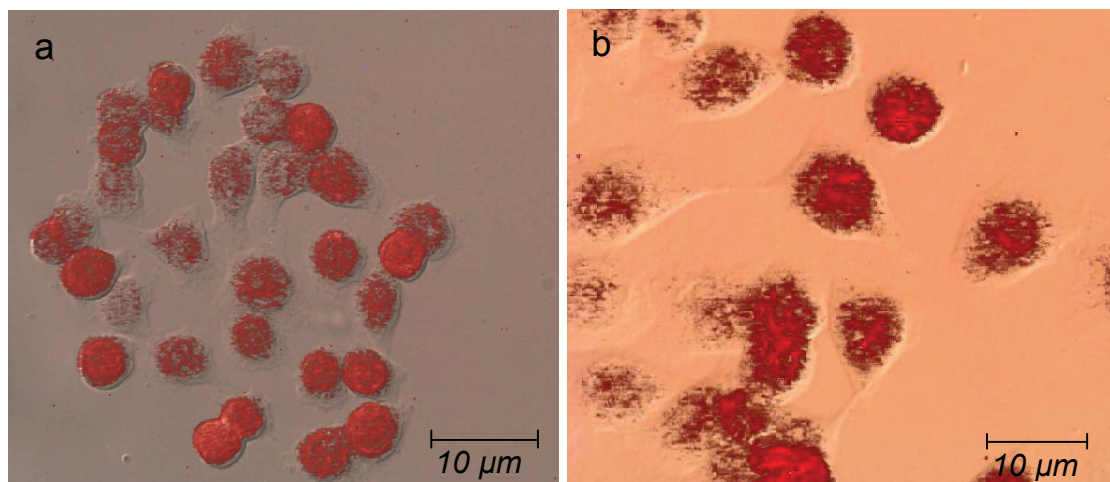


Abbildung 5.2-7 Inhomogene Immunfärbung mit Cy3 für GR (rot) in der Zellpopulation von HepG2-Zellen. Einige Nuclei zeigen eine starke nukleäre Reaktion (a), das Zytoplasma ist nicht angefärbt (b).

Als Negativkontrolle wurde, wie beschrieben, ein Objektträger mit Zellen behandelt. Es wurde jedoch der primäre Antikörper weggelassen, sodass der zweite Antikörper nicht spezifisch binden konnte. Eine Färbung der Kontrollzellen war nicht zu beobachten.

5.2.2 RT-PCR

Um sicherzustellen, dass die verwendeten mRNAs noch nicht degradiert waren, wurde eine RT-PCR-Reaktion für das β -Actin-Transkript durchgeführt. Zur Detektion von GR α -, GR β - und hCBG-mRNAs wurde die in Kap. 4.2.1.5 beschriebene Methode verwendet. Als Positivkontrolle erfolgte wieder eine Bestimmung an HepG2-RNAs. Als Negativkontrolle diente ein RT-PCR-Ansatz ohne cDNA-Template.

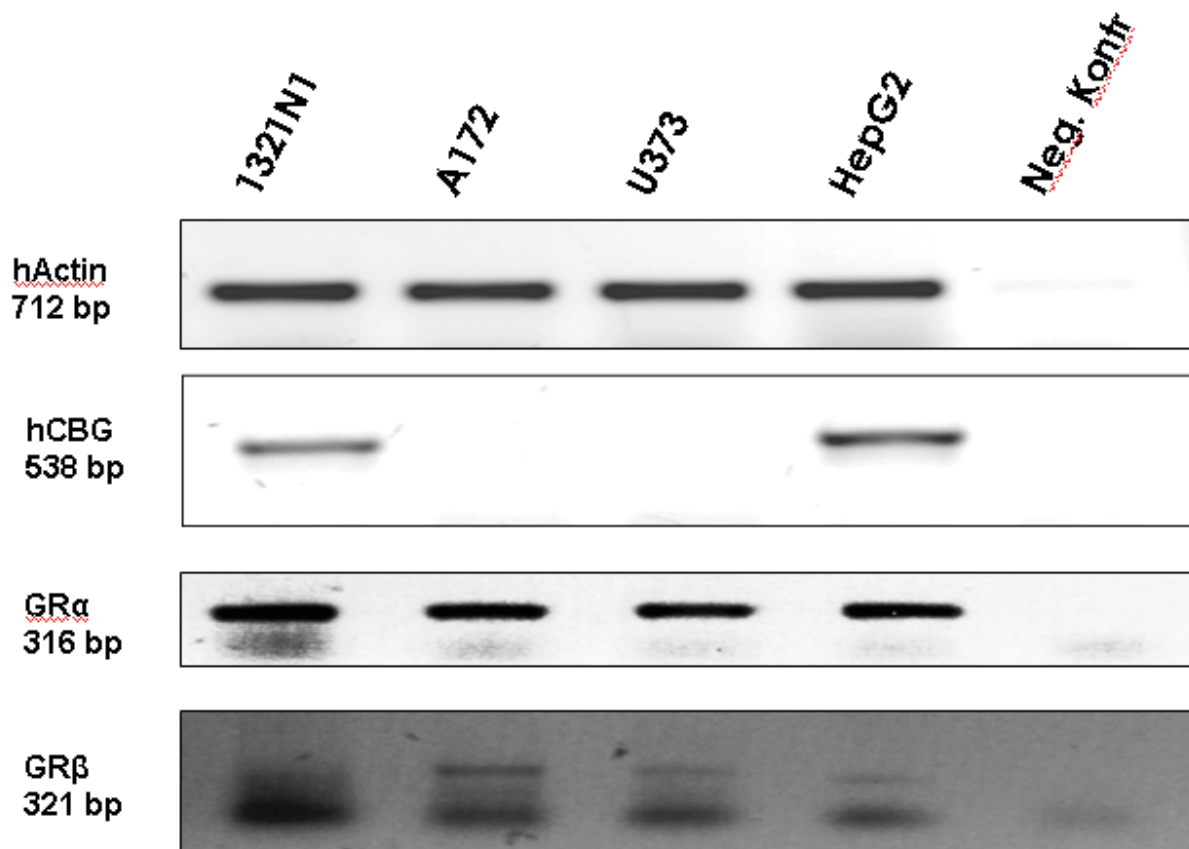


Abbildung 5.2-8 Agarose-Gelelektrophorese-Bild der in den RT-PCR-Reaktionen zum Nachweis von β -Actin-, hCBG- sowie GR α - und GR β -Transkripten erhaltenen Amplifikate.

Wie in Abbildung 5.2-8 ersichtlich, war bei der Negativkontrolle in allen vier Experimenten kein PCR-Produkt enthalten. Bei der mitgeführten Positivkontrolle konnte hingegen in allen Versuchen ein deutliches Signal detektiert werden. Vom ubiquitär vorkommenden β -Actin waren in allen unseren getesteten Zelllinien sehr intensive Banden zu erkennen, sodass aufgrund des daraus zu schlussfolgernden

umfangreichen Vorkommens der β -Actin-mRNA von der Unversehrtheit der verwendeten RNA-Proben ausgegangen werden kann.

GR α - und GR β -Banden waren ebenfalls zu erkennen, sodass eine Expression beider Rezeptor-Subtypen als gesichert angesehen werden kann. Das CBG-Transkript konnte allerdings nur in HepG2- und 1321N1-Zellen nachgewiesen werden, was die in Kap. 5.2.1 beschriebenen immunhistochemischen Ergebnisse bestätigt. In den Zelllinien A172, U373, SNB19, DBTRG und LN405 konnte CBG-mRNA hingegen nicht gefunden werden.

In einem späteren Schritt wurde noch untersucht, ob das im Tumor gefundene Protein die gleiche Aminosäuresequenz aufweist wie CBG aus HepG2-Zellen (siehe Kap. 5.2.3).

5.2.3 Klonierung und Sequenzierung von CBG

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine vollständige cDNA für das humane CBG aus 1321N1-Astrozytom- und HepG2 - Leberkarzinom-Zellen hergestellt werden (siehe Kap. 5.2.4). Die cDNAs aus beiden Zelllinien sollten nach dem PCR-Amplifikations-Schritt jeweils in einen *pGEMT*-Vektor kloniert werden. Da HepG2-Zellen die funktionell aktive Form des CBG sezernieren und diese Produktion charakterisiert und publiziert worden ist (Khan et al. 1984, Mirshahi et al. 2006), wurde diese Zelllinie für die hier beschriebenen Arbeiten als Positivkontrolle benutzt. Mit dieser wurde auch ein eukaryotischer Expressionsvektor *pIRES-EGFP* hergestellt.

Die CBG enthaltenden Fragmente wurden unter Verwendung der Primer **BamHI**-hCBG (5'-aaa **GGATCC**GGCCTGGCTATACTGGACAA-3') und **PstI**-hCBG (5'-aaa**CTGCAGTCTGGTTGGAGGGAGAAGAA**-3) mittels Standard-PCR erzeugt. Die PCR-Produkte wurden mit dem Vektor *pGEMT* ligiert. Die PCR-Primer wurden so ausgewählt, dass die für die Klonierung geplante CBG-Sequenz die für die Translation benötigten Start- und Stopp-Signale beibehielt. Darüber hinaus wurden so zusätzliche Restriktionsstellen (5'-Ende – BamH I; 3'-Ende – PstI) eingefügt (Abbildung 5.2-9a, b). Nach der in Kap. 4.2.2.6.1 beschriebenen Aufarbeitung gelang es, die CBG-Sequenzhaltigen *Full-Lenght*-Klone herzustellen (Abbildung 5.2-9c, d).

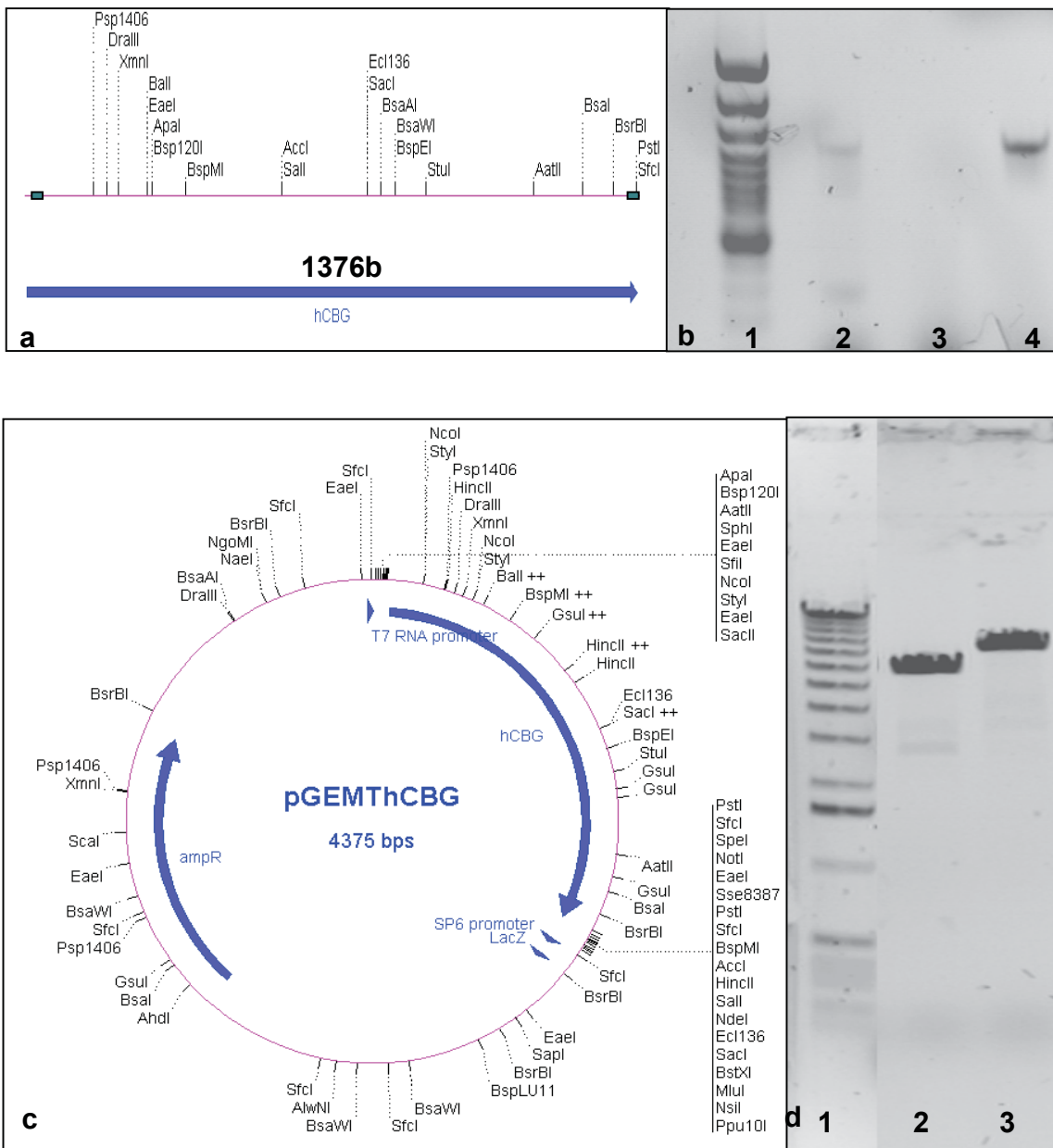


Abbildung 5.2-9 a) Schematische Darstellung des 1.376 bp großen CBG-Genabschnitts mit Restriktionsstellen. b) Agarose-Gelelektrophorese-Bild, Spalte 1: 100 bp-Ladder (Marker); Spalte 2: 1321N1; Spalte 3: Negativkontrolle; Spalte 4: HepG2. c) Schematische Darstellung des *pGEMT-s* mit CBG-Insert. d) Agarose-Gelelektrophorese der *BamH-I*-Restriktionsreaktion der „leeren“ Plasmide (Spalte 2) und dem CBG-Klons (Spalte 3); Spalte 1: 100 bp-Ladder (Marker).

Ergebnisse

Die Sequenzierung und die folgende *Blast*-Analyse der Klone ergaben für das CBG-Gen aus den HepG2-Zellen keine wesentlichen Abweichungen von den in den Datenbanken verzeichneten Sequenzen. Dagegen zeigte die CBG-Sequenz aus den 1321N1-Zellen (im Folgenden gCBG genannt) nur eine 95 %ige Übereinstimmung mit dem „Standard-Datenbank-Gen“ (im Folgenden hCBG genannt). Trotz 95 %iger Homologie beider Genvarianten, konnten insgesamt 60 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) in der gCBG-Sequenz gefunden werden. Davon führen allerdings nur 18 SNPs zu einem Aminosäureaustausch, 25 haben hingegen keine Auswirkung auf die Proteinsequenz. Eine Deletion in Position 1194 und die dadurch verursachte konsequente Leserahmenverschiebung führte zur Generierung eines neuen Stoppsignals und damit zum vorzeitigen Translationsabbruch. Die restlichen Mutationen sollten keine Auswirkung auf die Proteinsequenz haben.

Der Vergleich mit bekannten Mutationen innerhalb des CBG-Gens, die zum Funktionsverlust und damit zu einer klinischen Krankheitsausbildung führen (Torpy und Ho 2007), ergab keine Übereinstimmungen (Abbildung 5.2-10).

Ergebnisse

UNIPROT:[CBG_HUMAN_P08185](#) Corticosteroid-binding globulin (405 aa) initn: 2318
 init1: 1308 opt: 2317 Z-score: 2814.8 bits: 529.9 E(): 2.6e-148
 Smith-Waterman score: 2317; 92.383% identity (94.568% similar) in 405 aa
 overlap (1-404:1-400)

	10	20	30	40	50	60
gCBG (Clone2)	MPLLLYTCFLWLST	SGLWTVQAMPNAA	YRNMSN	NHHRGLAAVNVD	FALS	SLYKHLVALSPK

hCBG (P08185)	MPLLLYTCLLWLPT	SGLWTVQAMPNAA	YVNMSN	NHHRGLASANVD	FAFS	SLYKHLVALSPK
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
gCBG (Clone2)	KNIFISPVSISMAL	AMLSLGT	CGHTRAQLLQGL	GFNLTERSE	TEIHQGFQHLH	QLF

hCBG (P08185)	KNIFISPVSISMAL	AMLSLGT	CGHTRAQLLQGL	GFNLTERSE	TEIHQGFQHLH	QF
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
gCBG (Clone2)	RSLEMTMGNALFLD	GSLELLES	FSADIKHYE	SEVLAMNFRD	WATASGQINSY	VKSKTQ

hCBG (P08185)	TSLEMTMGNALFLD	GSLELLES	FSADIKHYE	SEVLAMNFQD	WATASRQINSY	VKNKTQ
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	
gCBG (Clone2)	KIADLLSGLDSPAI	LVLVNYTFF	FKGTWAQHFD	LASTGE-NFY	VDETTVVVKV	PMMPQSST

hCBG (P08185)	KIVDLFSGLDSPAI	LVLVNYIFF	FKGTWTQPF	DLASTREENFY	VDETTVVVKV	PMLQSS
	190	200	210	220	230	240
	240	250	260	270	280	290
gCBG (Clone2)	SYFHDSELP	QLVQLNYAG	NGTVFFILP	DKGKMNTVIA	AALS	SRDTINRWSAGLTNSQVDLY

hCBG (P08185)	SYLHDSELP	QLVQMN	YVNGTVFFILP	DKGKMNTVIA	AALS	SRDTINRWSAGLTSSQVDLY
	250	260	270	280	290	300
	300	310	320	330	340	350
gCBG (Clone2)	IPKVTISGVYDLG	DVLEEMGIAD	LFTNQANFSG	ITQDAQLKSS	KVVKAVLQ	LSEEGVDT

hCBG (P08185)	IPKVTISGVYDLG	DVLEEMGIAD	LFTNQANFS	RITQDAQLKSS	KVVKAVLQ	LNEEGVDT
	310	320	330	340	350	360
	360	370	380	390	400	410
gCBG (Clone2)	AGSTGVSINLTSK	PIILRFNQ	PFIIMSSTT	SPGA	AFSWPGL* TQRKRPLTQSLSTI*LWA	

hCBG (P08185)	AGSTGVTLNLT	SKPIILRFNQ	PFIIMIFDH	----- FTWSSLFLARVMNPV		
	370	380	390	400		
	420	430	440			
gCBG (Clone2)	PGTPWKCFGEW	EVSPNLLQVLL	PPTR			

Abbildung 5.2-10 Vergleich Aminosäuresequenz des gCBG Klons aus 1321N1 mit Referenzsequenzen des humanen Corticosteroid-binding globulin precursor (hCBG), für die Steroidbindung essentielle Asparagin-gebundene Glykosylierungspositionen, konservatives Cystein innerhalb der Steroidbindungsdomänen.

Ergebnisse

Um die Frage zu beantworten, ob die 1321N1-Zellen imstande sind, ein theoretisch funktionsfähiges CBG-Protein zu produzieren, wurde zuerst eine abgeleitete gCBG-Aminosäuresequenz mit der Datenbanksequenz verglichen. Diese Analyse zeigte eine 92 %ige/95 %ige Identität/Vergleichbarkeit der gCBG-Proteinsequenz aus den Astrozytomzellen mit bekannten Sequenzen. Darüber hinaus wurden die Sequenzpositionen, die für Bindungsaktivität als essentiell bekannt sind (Avvakumov et al. 1993), überprüft. So konnte gezeigt werden, dass die für die Steroidbindung essentielle Asparagin-gebundene Glykosylierung bei den Positionen 31, 96, 260 und 369 und ebenso das konservative Cystein innerhalb der Steroidbindungsdomäne im gCBG enthalten sind (Abbildung 5.2-10).

Da die Funktion des CBG direkt von seiner posttranslationalen Modifikation abhängt, führten wir eine N-Glykosylierungs-Analyse (Gupta und Brunak 2002) am *NetNGlyc Server* durch. Dieses Programm erkannte *N-glycosylation Sequenzen* Asn-Xaa-Ser/Thr oder Asn-Xaa-Cys und ermöglichte somit eine diskriminierende Vorhersage über die Glykosylierungsrate des Proteins. Mit dieser Analyse-Methode konnte gezeigt werden, dass das gCBG das gleiche Potenzial wie hCBG hat und an fünf Positionen Zuckerketten binden kann (Abbildung 5.2-11).

Es kann geschlussfolgert werden, dass die 1321N1-Zellen in der Lage sind, ein trotz Sequenzabweichungen, funktionell aktives CBG zu produzieren.

Output for gCBG (Clone 2)

Name: gCBG (Clone 2) Length: 443
 MPLLLYTCFLWLSTSGLWTVQAMDPNAAAYR**NMS**NHHRGLAAVNVDFA**LS**LYKHLVALSPKKNIFISPVISMALAMLSLG 80
 TCGHTRAQLLQGLGF**NL**TERSETEIHQGFQHLHQLFTESDRSLEMTMGNALFLDGSLELLESFSA**DIK**HYYESEVLAMNF 160
 RDWATASGQINSYVKS**KT**QGGKIADLLSGLDSPAILVLV**NY**TFKGTWAQHFDLASTGENFYVDETTVVKKVPMFQSSTMS 240
 YFHSELPCQLVQLNYAG**NG**TVFFILPDKGKMNTVIAALS**RD**TINRWSAGLTNSQVDLYIPKVTISGVYDLGDVLEEMGI 320
 ADLFTNQAN**FS**GITQDAQLKSSKVVHKAVLQLSEEGVDTAGSTGVSL**NL**TSKPIILRFNQPFIMSSSTTSPGAAFSWPGL 400
 TQRKRPLTQSLSTILWAPGTPWKCFGEWEVSPNLLQVLLPTR
N..... 80
N..... 160
N..... 240
N..... 320
N..... 400
 480

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	31 NMSN	0.6598	(9/9)	++
Sequence	96 NLTE	0.6382	(8/9)	+
Sequence	199 NYTF	0.6822	(9/9)	++
Sequence	259 NGTV	0.7970	(9/9)	+++
Sequence	329 NFSG	0.4061	(7/9)	-
Sequence	368 NLTS	0.6423	(9/9)	++

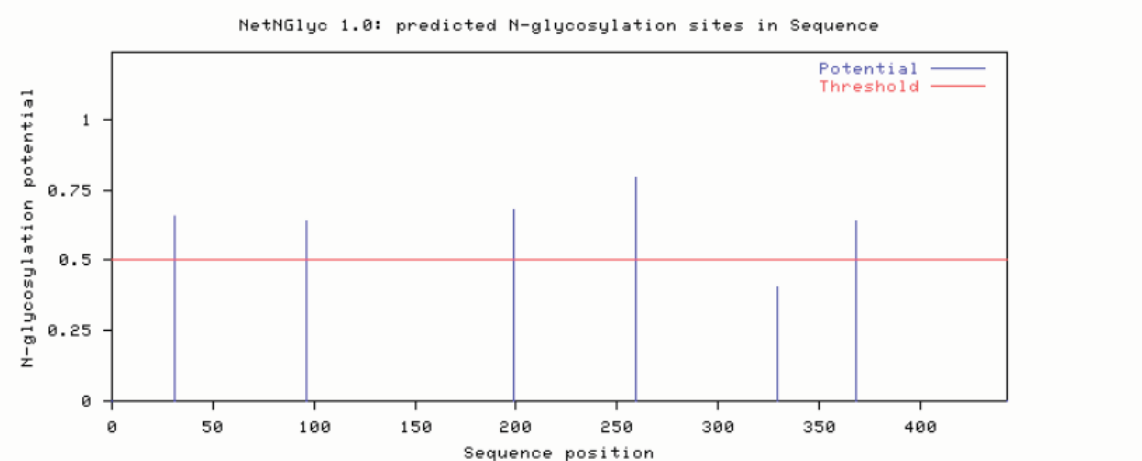


Abbildung 5.2-11 Vom *NetNGlyc 1.0* Server vorhergesagtes Glykosylierungsergebnis. Die **Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequenzen** in der Proteinsequenz sind blau hervorgehoben, die vom Programm als N-glykosyliert vorhergesagten **Asparagine** rot. Die untere Grafik zeigt die postulierten N-Glykosylierungsstellen entlang der Proteinsequenz (x-Achse repräsentiert die Proteinkette vom N- zum C-Terminus). Die blauen Linien, die den Schwellenwert überschreiten, symbolisieren die vorhergesagten Glykosylierungsstellen.

Ergebnisse

Die physiologische Bedeutung der lokalen CBG-Produktion in Tumorzellen könnte vielseitig sein. Um hinsichtlich dieser Fragestellung neue Erkenntnisse zu erhalten, könnte ein transientes oder dauerhaftes Expressionsmodell von großer Hilfe sein.

In den hierzu durchgeführten Experimenten sollte eine hCBG-Sequenz aus dem CBG-*pGEMT*-Vektor in den eukaryontischen Expressionsvektor *pIRES-EGFP* umkloniert werden. Die positiven Klone wurden nach der Sequenzverifizierung für die weiteren Transfektions-Experimente benutzt. Parallel dazu wurden „leere“ Klone als Mock-Kontrolle verwendet. Um einen orientierten Einbau der DNA-Fragmente zu ermöglichen, wurden folgende Primer verwendet: *Cla*I-hCBGvor aaaATCGATATGccactcctcctgtacacc und *Eco*R I-hCBGrev aaaGAATTCttacactggg ttcataacc. Die PCR-Produkte (Abbildung 5.2-12a) wurden nach Trennung mit einer Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung mit dem *Gel Extraction Kit* (Zymo) wie der leere *pIRES*-Vektor mit *Eco*R I und *Cla* I geschnitten und beide Restriktionsansätze anschließend ligiert. Die über den Restriktionsverdau ermittelte Länge des Inserts von ca. 1200 bp stimmte gut mit der Länge des CBG-Transkripts überein, sodass von einer Isolation vollständiger Klone ausgegangen werden kann. Die Sequenzen der positiven Klone (Abbildung 5.2-12b) wurden nach der Sequenzierung mit Datenbank-Sequenzen aus *NCBI PubMed* verglichen. Es zeigten sich dabei keine wesentlichen Abweichungen. Der Abgleich der Sequenzen wurde mit dem Programm *Blast* durchgeführt.

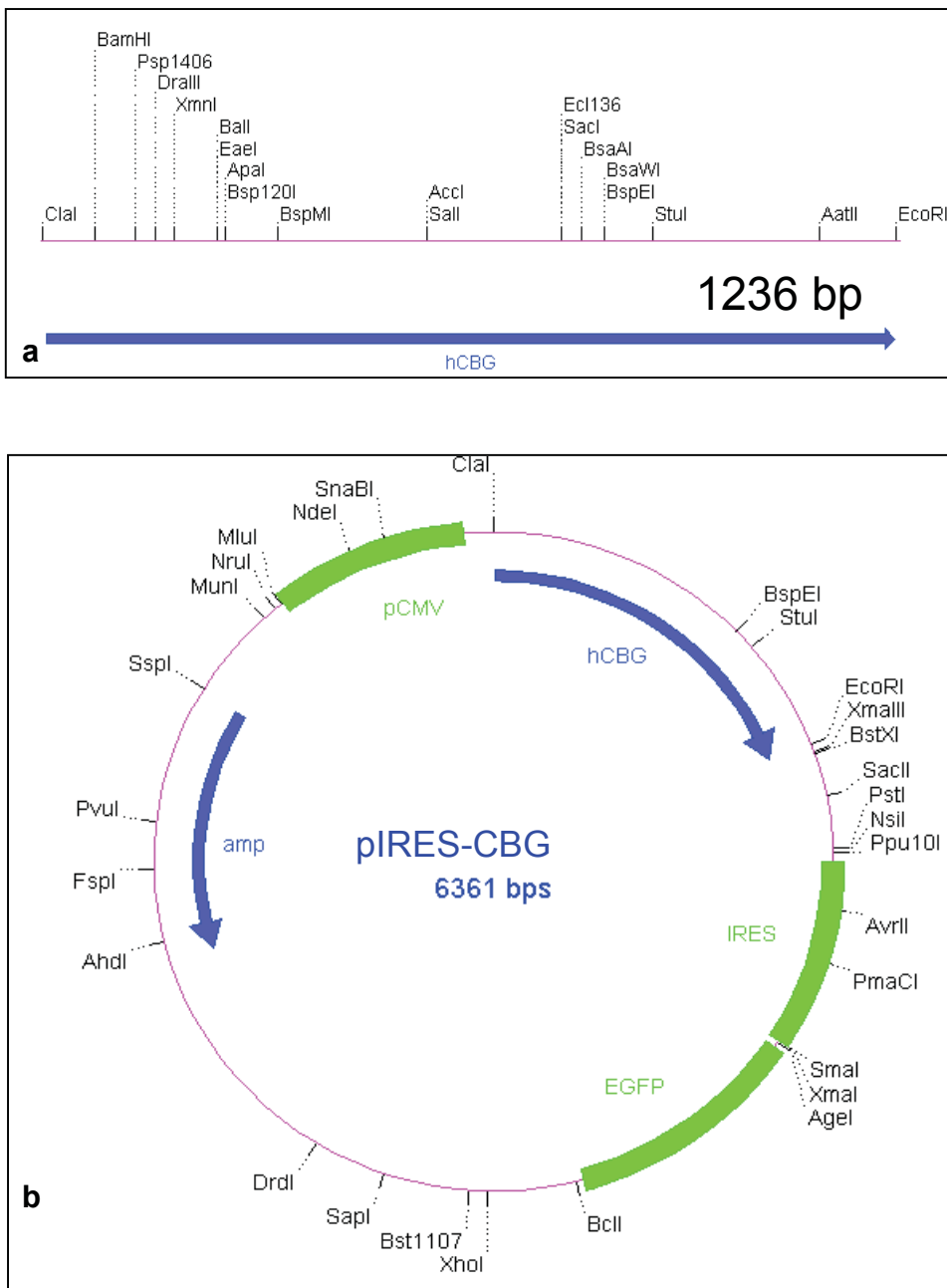


Abbildung 5.2-12 a) Schematische Darstellung des 11236 bp langen hCBG-Genabschnitts mit Restriktionsstellen und den enthaltenen Start- und Stoppstellen. b) Schematische Darstellung des 6361 bp langen *pIRES-EGFP*-Vektors mit CBG-Insert. *pCMV* – Cytomegalovirus Promotor; *amp* – Ampicillin-Resistenz-Gen; *EGFP* – kodierende Sequenz für *enhanced green fluorescent protein*; *IRES* – *internal ribosomal entry site*.

Das hCBG wurde zwischen die Schnittstellen *Cla I* und *EcoR I* (im Leserahmen mit EGFP) in die *multiple cloning site* (MCS) des *pIRES-EGFP*-Vektors (siehe

Kap. 4.1.10) kloniert (Abbildung 5.2-12). Diese Klone wurden für die in Kap. 4.2.2.7 beschriebenen Transfektionsexperimente verwendet.

5.2.4 Transfektion

Mit den Transfektions-Experimenten sollten neue Erkenntnisse über die Rolle des CBG gewonnen werden. In einem Vergleichsexperiment sollte eruiert werden, welche Funktionen CBG nach Transfektion in die CBG-freie Glioblastom-Zelllinie A172 übernimmt. Es sollte untersucht werden, wie sich das Reaktionsverhalten der Zelllinie unter Cortisolbehandlung im Vergleich zu untransfizierten, CBG-freien Zellen verändert. Als Kontrolle fungierten hierbei A172-Zellen, welche mit dem Leervektor transfiziert wurden (*mock*-Transfektion).

Bei den Optimierungsversuchen konnten im dritten Durchgang die besten Resultate erzielt werden. Allerdings lag die Effizienz, gemessen an EGFP-positiven Zellen, einen Tag nach der Transfektion nur in einer Größenordnung von 3 – 5 %.

5.2.5 Proteinanalyse

Mit der Proteinanalyse aus der Zellkultur wurde wie in Kap. 4.2.2.8 beschrieben versucht, das CBG-Protein und mögliche physiologische, intrazelluläre Interaktionspartner durch Co-Immunpräzipitation zu identifizieren.

Die Proteinproben für eine *1D-PAGE* wurden wie in Kap. 4.2.2.8.3 beschrieben gewonnen. Nach Gelfixation und Färbung konnten drei separate Banden bei ca. 70 (H3), 55 (H2) und 45 (H1) kDa identifiziert werden (Abbildung 5.2-13).



Abbildung 5.2-13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Spalte 1: Trial Mix Protein Marker. Spalte 2: eindimensionale Auftrennung der Proteine aus 1321N1-Zellen nach Co-Immünpräzipitation. Nach Coomassie-Blau-Färbung sind drei separate Banden bei ca. 70 (H3), 55 (H2) und 45 (H1) kDa zu erkennen.

Die Proben wurden dann wie in Kap. 4.2.2.8.4 beschrieben mit der MALDI-TOF-Methode analysiert. Mit dieser Methode sollte untersucht werden, ob die CBG-Aufreinigung bei der Immunpräzipitation der Proteine aus den 1321N1-Zellen erfolgreich war.

CBG war in der H2-Bande (55 kDa) zu vermuten. Diese wurde nun mit MALDI-TOF untersucht. Dabei wurden die nach dem Trypsin-Verdau entstandenen spezifischen Peptidmassen-Fingerabdrücke (*peptide mass fingerprint*, PMF) gewonnen. Dabei wird das Protein enzymatisch an einer spezifischen Stelle geschnitten, sodass charakteristische Peptidfragmente entstehen. Häufig wird das zu identifizierende Protein mit Trypsin (wie in unserem Fall) verdaut, welches spezifisch nach Arginin und Lysin schneidet. Die ermittelten Peptidmassen wurden dann mit den theoretisch verdauten Massen einer Proteindatenbank verglichen. So konnte, unter Beachtung bestimmter Parameter, eine sehr sichere Identifizierung des Proteins erreicht werden. Hierzu sind keine experimentellen Informationen über die Aminosäuresequenz nötig. Ein wesentlicher Nachteil dieses Prozesses ist jedoch, dass Proteine nur dann identifiziert werden können, wenn sie in einer Datenbank eingetragen sind oder die möglichen posttranslationalen Modifikationen bekannt sind.

Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die lokal gespeicherte NCBI-Datenbank benutzt, die Analysen erfolgten mit dem Programm *ProteinScape Gelviewer*. Die Routineanalyse ergab keinen Nachweis von CBG. Nur nach manueller Implementierung aller bekannten posttranslationalen Modifikationen ließ sich das CBG identifizieren (Abbildung 5.2-14).



Abbildung 5.2-14 MALDI-Spektrum der CBG-Immünpräzipitation eines Homogenates aus 1312N1-Zellen.

Um die möglichen Interaktionspartner resp. Rezeptoren des CBG in den Co-Immünpräzipitaten zu identifizieren, wurden die H1 und H3 Banden analysiert.

5.2.6 Bindungsassay und Bindungs-Dot-Blot

Mit dem Bindungsassay und dem Bindungs-Dot-Blot sollte untersucht werden, ob das von der Zelllinie 1321N1 gebildete CBG funktionell aktiv ist.

Der Unterschied der beiden Methoden besteht einerseits in der unterschiedlich aufgetragenen Menge der Proben – 200 μ l beim Assay vs. 10 μ l beim Dot-Blot –, andererseits in der Oberflächenbeschichtung der *well*-Platten – herkömmliche 96*well*-MTP beim Assay vs. Cyto-Platten beim Dot-Blot. Dies führt zu unterschiedlichen Empfindlichkeiten der beiden Tests. Zusätzlich unterscheiden sich die Methoden hinsichtlich des in der Detektionsreaktion durch HRP umgesetzten Substrats – Bindungsassay: TMB; Dot-Blot: DAB. Die Absorptionswerte wurden beim Bindungsassay mit dem MTP-Reader Spectra max plus (Molecular Devices) bei 450 nm mithilfe der Software *soft max Data pro 4.0* gemessen. Die Farbreaktion beim Dot-Blot wurde mit dem Canon-Scanner der Software *Cyto 3.5* ausgewertet. Um die Werte zu normalisieren, wurde von jeder Messgruppe der Mittelwert errechnet und anschließend jeder einzelne Messwert durch diesen errechneten Mittelwert dividiert.

Der Absorptionswert für die HepG2-Zellen ist am größten. Dies verwundert nicht, da diese zur Positivkontrolle mitgeführt wurden, weil sie, wie bereits mehrfach beschrieben, nachweislich das funktionelle CBG produzieren und sezernieren (Khan et al. 1984, Mihrshahi et al. 2006). Für die Negativkontrolle (IP-Lysispuffer) wurden erwartungsgemäß die geringsten Werte gemessen, die aufgrund unspezifischer Bindungen zwischen der Oberfläche der *wells* oder anderen Proteinen mit Cortisol > 0 betragen. Die Absorptionswerte der Proben aus 1321N1 waren stärkere als bei U373. Wird der Mittelwert der HepG2-Bestimmung als 100 %ige Bindung von markiertem Cortisol an das CBG angenommen, wird ersichtlich, dass in der Zelllinie 1321N1 auch prozentual berechnet mehr markiertes Cortisol an CBG bindet als in U373-Zellen (Abbildung 5.2-15).

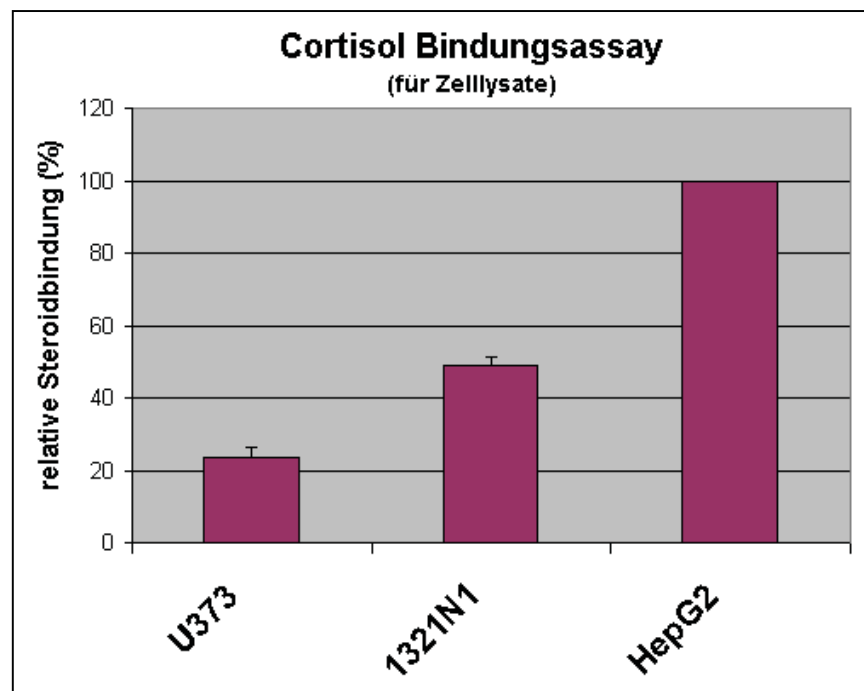


Abbildung 5.2-15 Graph der normalisierten Mittelwerte des gebundenen Cortisols [%] (aus Zelllysaten gewonnen) im Bindungsassay.

Für den Bindungs-Dot-Blot ergab sich ein ähnliches Ergebnis (Abbildung 5.2-15). Auch hier wurde bei der Positivkontrolle der höchste, bei der Negativkontrolle der niedrigste Wert (ebenfalls > 0) gemessen. Die Bindung von markiertem Cortisol an CBG war absolut und relativ (gleiche Berechnungsgrundlage wie beim Bindungsassay) in 1321N1-Zellen höher als in U373 (Abbildung 5.2-16).

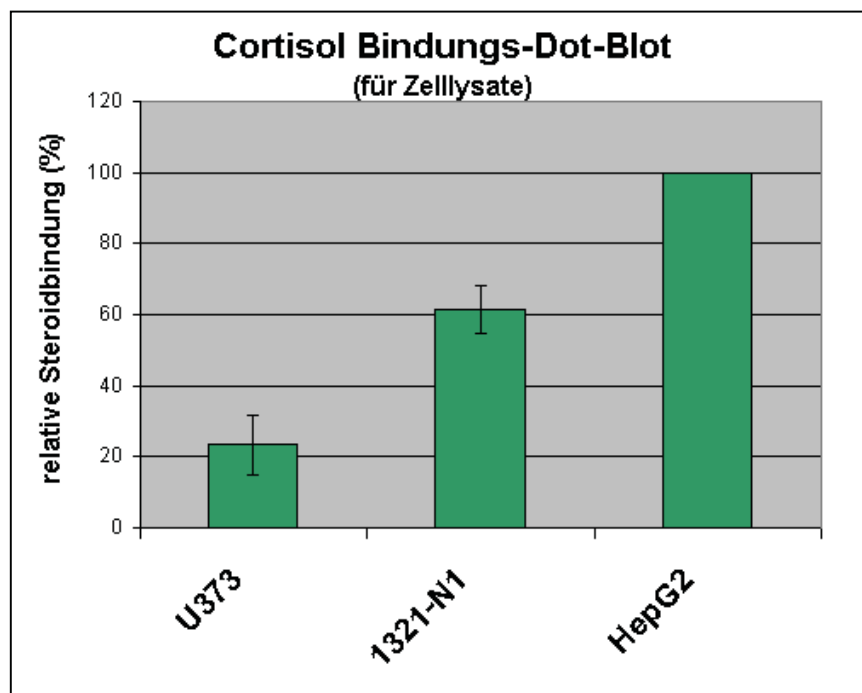


Abbildung 5.2-16 Graph der normalisierten Mittelwerte des gebundenen Cortisols [%] (aus Zelllysaten gewonnen) im Bindungs-Dot-Blot.

Für den Bindungsassay mit den Zelldialysaten ergaben sich nach der Normalisierung (HepG2 – 100 %) die in Abbildung 5.2-17 dargestellten Werte.

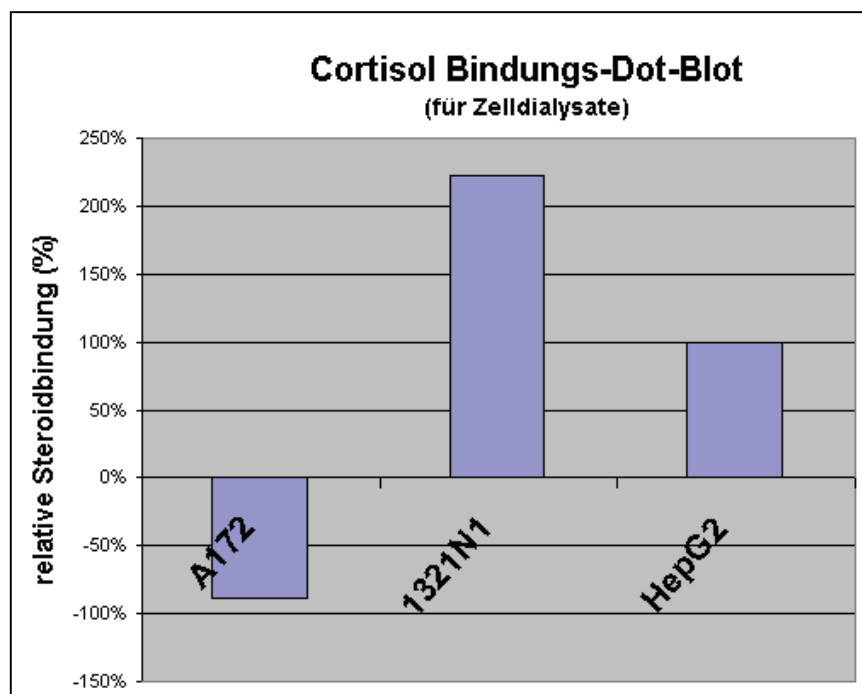


Abbildung 5.2-17 Graph der normalisierten Mittelwerte des gebundenen Cortisols [%] (aus Zelldialysaten gewonnen) im Bindungs-Dot-Blot.

Bei den Analysen der Zelldialysate wurde deutlich, dass in 1321N1 mehr Cortisol gebunden wird als in A172-Zellen.

Wenn man die Ergebnisse aus allen drei Assays zusammen betrachtet, lässt sich mit großer Sicherheit schlussfolgern, dass das in der Astrozytom-Zelllinie 1321N1 gebildete CBG funktionell aktiv ist.

5.2.7 Sekretions-Dot-Blot

1321N1-Zellen wurden mit Hydrocortison (HC), Dexamethason (Dex) und Mifepriston (RU 486) behandelt, die Überstände abgesaugt und aufbewahrt.

Die Behandlung erfolgte mit Hydrocortison, weil diese Verbindung *in vitro* die gleichen genomischen und nicht-genomischen Effekte bewirkt, wie Cortisol *in vivo*. Folgende Konzentrationen wurden gewählt: 0,5; 0,25; 0,1 und 0,03 µg/ml. 0,25 µg/ml und 0,033 µg/ml stellen dabei die physiologisch maximal bzw. minimal erreichbaren Konzentrationen dar. Die Konzentration 0,1 µg/ml wurde aus einer Publikation entnommen, in der eine Behandlung von C6-Zellen beschrieben ist (Kumar et al. 1985). 0,5 µg/ml wurde gewählt, weil diese Dosis über dem physiologischen Maximum liegt.

Als zweite Substanz wurde Dexamethason eingesetzt. Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein synthetisches Glucocorticoid, welches eine 30fach stärkere Wirkung als körpereigene Glucocorticoide zeigt (Greten 2005). Ein weiterer Vorteil der Substanz ist, dass sie im Gegensatz zu den physiologisch vorhandenen GC kein mineralcorticoides Wirkpotential aufweist. Da Dex nur spezifisch via GR wirkt, kann die Substanz nur genomische Effekte vermitteln. In den hier vorgestellten Untersuchungen konnte somit ermittelt werden, ob die CBG Freisetzung über den nukleären Signalweg ausgelöst wird. Die eingesetzten Konzentrationen (50; 25; 10 nM) wurden in Anlehnung an verschiedene Publikationen gewählt (Das et al. 2004, Robe et al. 2005).

Als dritte Verbindung kam der GR-Antagonist Mifepriston (RU486) zum Einsatz. Der therapeutische Einsatz des, umgangssprachlich als „Abtreibungspille“ bezeichneten,

Ergebnisse

Mifepriston-haltigen Arzneimittels Mifegyne® erklärt sich hingegen aus einer antagonistischen Wirkung am Progesteron-Rezeptor (PR). In unseren Experimenten wurde die GR-antagonistische Wirkung genutzt, um den genomischen Signalweg auszuschalten und zu untersuchen, ob eine CBG-Freisetzung trotzdem, also über einen nicht-nukleären Signalweg, stattfindet. Wir verwendeten RU486 in der publiziert wirksamen Konzentration von 0,1 μM (Sengupta et al. 2000). Damit die GRs schon vor der Zugabe von HC und Dex blockiert waren, mussten die Zellen für 1 h mit Mifepriston vorinkubiert werden.

Die Spanne der Inkubationszeiten von 4, 5, 12, 24 und 36 h wurde gewählt, um die durch die Behandlungen erwartete CBG-Freisetzung zeitabhängig dokumentieren zu können.

Im ersten Sekretionsexperiment (Kap. 4.2.2.1) wurden 1321N1-Zellen mit Hydrocortison allein und in Kombination mit Mifepriston für 4, 12, 24 und 36 h behandelt, um herauszufinden, ob CBG freigesetzt wird und HC dafür einen auslösenden Faktor darstellt. In letzterem Fall sollten der Signalweg der HC-Wirkung und dessen mögliche Inhibition untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde mit den gewonnen Überständen ein Dot-Blot-Assay durchgeführt (Kap. 4.2.2.10). Zuerst wurden die Überstände in 96well-Cyto-Platten pipettiert, deren Oberfläche die Bindung von Proteinen ermöglicht. Für den Nachweis von CBG in Zellüberständen wurde die Streptavidin/Biotin-Methode mit einem primären anti-CBG-Antikörper, wie in Kap. 4.2.1.2.1 beschrieben, angewendet. Die Messwerte sind in Abbildung 5.2-18 grafisch dargestellt.

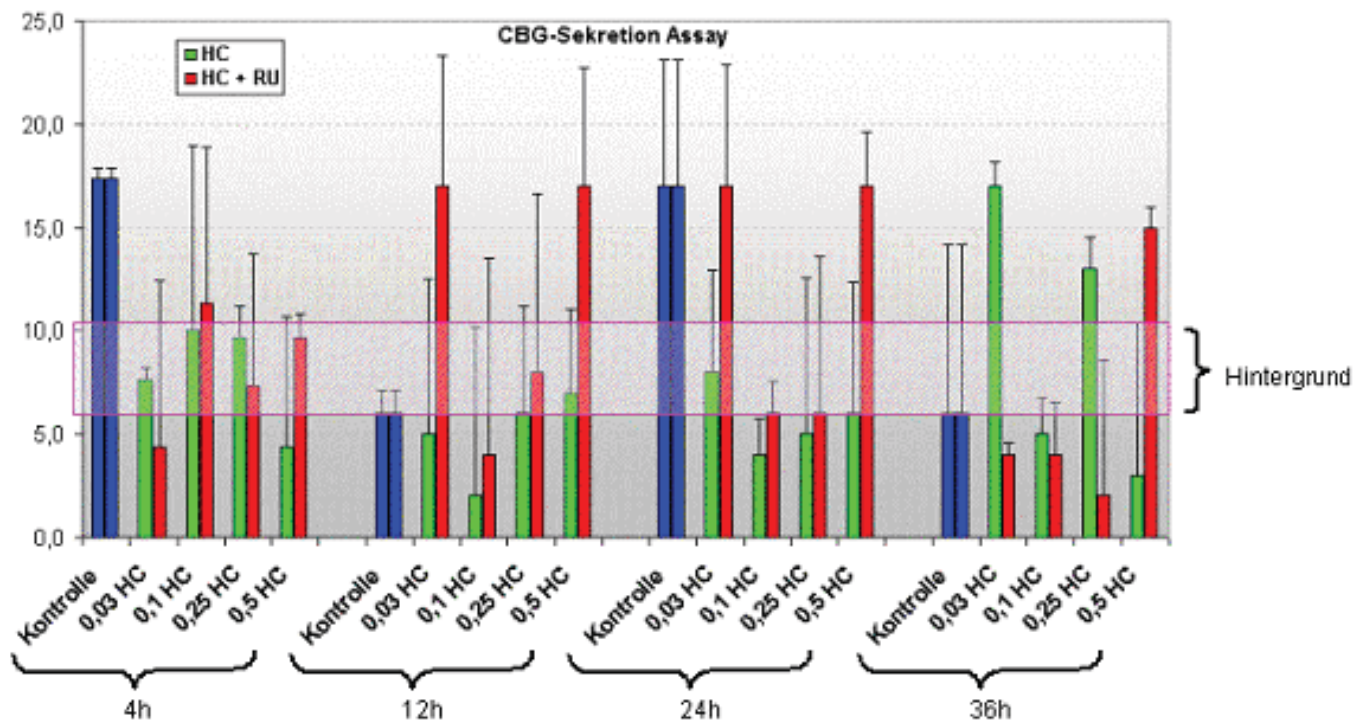


Abbildung 5.2-18 Graph des Sekretionsexperiments mit Hydrocortison und Mifepriston.

Zwischen den beiden violetten Linien des Graphen findet sich der Hintergrund der Messung. Die blauen Säulen stellen die Kontrollzellen ohne Behandlung dar. Grün ist die alleinige Hydrocortison-Behandlung, rot die Kombinationsbehandlung mit Mifepriston dargestellt. Bei Betrachtung der blauen Säulen ist deutlich zu erkennen, dass nach 4 und 24 h die Werte deutlich über dem Hintergrundsignal, während sie nach 12 und 36 h klar darunter liegen.

Anhand der grünen Säulen wird deutlich, dass HC eine kaum sekretionsfördernde Funktion ausübt. Lediglich nach 36 h ist bei der Behandlung mit 0,03 µg/ml und 0,25 µg/ml Hydrocortison ein deutlich sekretionsfördernder Effekt zu erkennen.

Mifepriston scheint die CBG-Sekretion nicht zu hemmen. Die GR-Blockade mit RU486 führte im Gegenteil eher zu einer Zunahme der CBG-Menge im Überstand.

Im zweiten Experiment wurden, wie in Kap. 4.2.2.1 beschrieben, 1321N1-Zellen für 5 h mit drei verschiedenen Hydrocortison- und Dexamethason-Konzentrationen

Ergebnisse

behandelt. Parallel dazu wurde eine weitere Behandlungsreihe mit dem Zusatz von 0,1 μ M Mifepriston durchgeführt. Der direkte Vergleich von HC- und Dex-Behandlung sollte Erkenntnisse über die Wirkstärke der beiden Substanzen hinsichtlich der CBG-Freisetzung erbringen. Mit der zusätzlichen Mifepriston-Behandlung sollte der Signalweg der CBG-Freisetzung näher betrachtet werden.

Mit den Überständen wurden wie zuvor beschrieben ein Dot-Blot durchgeführt (Abbildung 5.2-19).

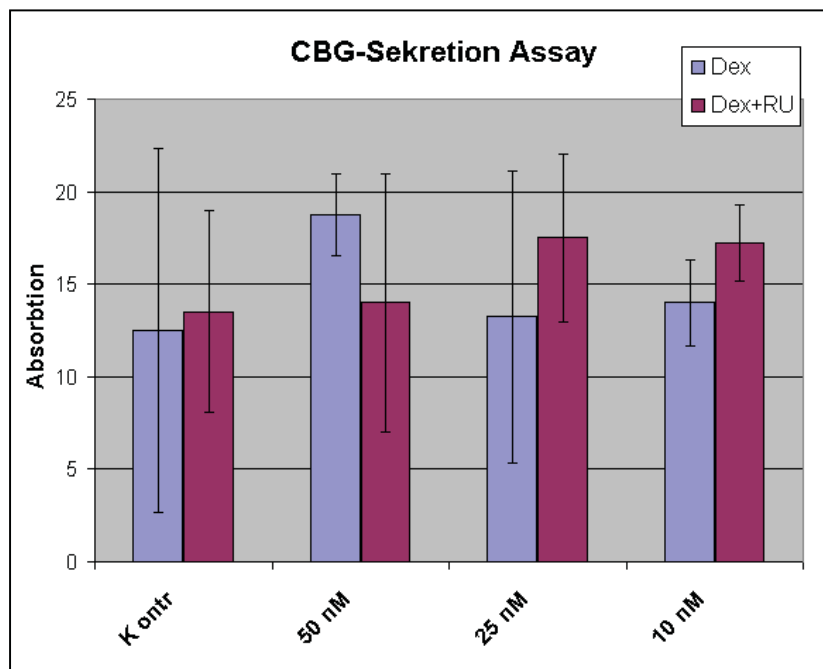


Abbildung 5.2-19 Graph des Sekretionsexperiments mit Dexamethason nach 5 h.

In Abbildung 5.2-19 sind die Werte der Dexamethason-Behandlung blau, die der Kombinationsbehandlung mit RU486 violett dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass Dexamethason im Vergleich zu Hydrocortison keinen fördernden Effekt auf die CBG-Freisetzung ausübt, ebenso wenig die Kombination aus Dexamethason und Mifepriston.

6 Diskussion

6.1 Topografie der Verteilung des CBGs im Rattengehirn

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit widmete sich der Topografie der Verteilung von CBG im Gehirn der Ratte. Die dargestellten Befunde zeigen, dass im zentralen Nervensystem der Ratte ein intrinsisches CBG-System vorhanden ist, welches unabhängig von den bereits bekannten Expressionsorten Leber, Niere und Magen-Darm-Trakt existiert. Aufgrund seines Molekulargewichts von 45,1 kDa ist das systemisch vorhandene CBG nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. Kürzlich wurde durch unsere Arbeitsgruppe entdeckt, dass CBG in magnozellulären Neuronen des NPV, des NSO und in assoziierten Kernen teilweise mit den HHL-Hormonen Oxytocin (OT) und Vasopressin (VP) co-lokalisiert ist (Mopert et al. 2006). Viele CBGs immunpositiver neuronaler Vorsätze erschienen im lateralen Hypothalamus, im *Nucl. suprachiasmaticus* und im *Nucl. arcuatus*. Die Lokalisation des CBG in den Axonen und axonalen Varikositäten des lateralen Hypothalamus, der *Eminentia mediana* und des HHL deutet auf einen Neurohormon-ähnlichen Transport und eine ebensolche Speicherung hin. Die Co-Lokalisation von CBG mit den klassischen Neuropeptiden OT & AVP in neuroendokrinen Projektionen wurde zuvor bereits nachgewiesen (Mopert et al. 2006). Es ist bekannt, dass oxytocinerge und vasopressinerge Neurone in das Mesencephalon, den Hirnstamm und die präoptische Region projizieren (Jirikowski et al. 1988).

Seitdem bekannt ist, dass das CBG ebenfalls in einigen dieser Neuronen enthalten ist, kann angenommen werden, dass ähnliche Projektionen auch für CBG bestehen. Die Demonstration, dass eine Colchicin-Behandlung die CBG-Immunreaktivität in den Zellkörpern stark ansteigen lässt, unterstützt zusätzlich die Idee, dass das CBG unter normalen Bedingungen einem hohen sekretorischen Umsatz unterworfen ist. Denn Colchicin ist ein Spindelgift, welches an den freien Tubulin-Proteinen bindet und deren Polymerisation verhindert. So kann das Mikrotubulus-System seinen Funktionen nicht mehr nachkommen. Somit wird der Spindelapparat bei der Zellteilung nicht richtig

ausgebildet und die Trennung der Chromosomen kann nicht stattfinden. Zusätzlich wird die Wanderung von neutrophilen Granulozyten gehemmt.

Ob CBG von den Nervenenden freigesetzt werden kann, wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Allerdings wiesen (Herbert et al. 2006) durch Immun-Elektronenmikroskopie SHBG in dichten sekretorischen Vesikeln nach. Daher ist es denkbar, dass SHBG vom Gehirn und der Hypophyse freigesetzt werden kann. Eine analoge Situation könnte auch für das CBG gelten.

(Mopert et al. 2006) konnten erstmals nachweisen, dass CBG im ZNS der Ratte ähnlich exprimiert wird wie SHBG.

Es ist bekannt, dass die SHBG-Expression vom systemischen Östrogenspiegel kontrolliert wird (Gao et al. 2003). Die Fragestellung, ob die CBG-Expression im Gehirn von Nebennierenhormonen kontrolliert wird, ist Gegenstand gegenwärtiger Studien.

In einer früheren Studie konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass CBG auch im menschlichen Hypothalamus gebildet wird. Magnozellular- und parvozelluläre hypothalamische Neurone exprimieren zusammen mit CBG auch OT und VP (Sivukhina et al. 2006). Ob humane extrahypothalamische Regionen ebenfalls zur CBG-Expression befähigt sind, wird gegenwärtig noch untersucht. Während CBG in der Peripherie für die Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) zuständig ist, ist seine Rolle im Gehirn noch nicht vollständig geklärt (de Kloet et al. 1984).

Es ist allerdings angebracht zu vermuten, dass das CBG im Gehirn auch in Stressantwort-Programme involviert ist. VP ist nicht nur an der ACTH-Freisetzung (Ma et al. 1997) beteiligt, sondern wird auch mit der zentralen Stressantwort assoziiert. (Engelmann et al. 2000) zeigten im „Schwimmtest“, dass dabei VP in vielen Gehirnarealen freigesetzt wird, während chronischer psychosozialer Stress (*social defeat stress*) Oxytocin freisetzt. Dies deutet darauf hin, dass VP und OT in die Stressantwort verwickelt sind, aber unter verschiedenen Bedingungen freigesetzt werden. Oxytocin wird hauptsächlich während der Geburt zentral und systemisch freigesetzt (Fuchs et al. 1982). Da das CBG mit OT und VP co-lokalisiert ist, lässt sich vermuten, dass es eine Rolle in der zentralen Kontrolle der Verhaltensantwort auf Stress übernimmt. Der parvozelluläre PVN ist das hauptsächlich CRF-bildende Gebiet

im Gehirn (Makino et al. 1995, Swanson und Simmons 1989) und daher für die Kontrolle der Adrenocorticotropin-Freisetzung wichtig. Von Glucocorticoiden ist ein Feedback-Mechanismus über die GRs im Gehirn bekannt (de Kloet et al. 1984, Makino et al. 1995). Interessanterweise sind GRs jedoch nur in wenigen Zellkörpern des PVN immunhistochemisch nachweisbar (Swanson und Simmons 1989, Agnati et al. 1985, Jirikowski et al. 1993). (Swanson und Simmons 1989) berichteten, dass Corticosteroninfusionen in das Gehirn die CRF-Expression im dorsalen PVN aktivieren. Dies deutet darauf hin, dass diese Neurone auf einen sich ändernden Gehirn-GC-Spiegel ansprechen. Das könnte entweder über umliegende GR-positive Interneuronen oder durch indirekte bzw. nicht-genomische Effekte von Nebennierenhormonen vermittelt werden.

CBG wurde in der inneren Schicht der *Eminentia mediana* in unmittelbarer Umgebung von Blutgefäßen gefunden. So könnte es, wie die klassischen Releasing-Faktoren, Zugang zur portalen Blutzirkulation des HVL bekommen. Immun-Elektronenmikroskopische Untersuchungen der ME sind in unserer Arbeitsgruppe derzeit in Planung. CBG-Immunreaktivität wurde in vielen endokrinen Zellen des HVL beobachtet, was die bisherigen Annahmen bestätigt. Wahrscheinlich tritt in einem Teil dieser Zellen eine intrinsische Expression des CBG auf (Mopert et al. 2006). Obwohl im Rahmen dieser Arbeit keine Co-Lokalisations-Experimente mit HVL-Peptiden durchgeführt wurden, deuten die hohe Anzahl immungefärbter Zellen, ihre Morphologie und ihre Verteilung an, dass die CBG-Immunreaktivität nicht, wie bisher angenommen, auf die corticotrophen Zellen beschränkt ist (de Kloet et al. 1984), sondern auch in anderen endokrinen Zellen auftritt.

In den Herring-Körpern des HHL wurden teilweise CBG-positive Zellen gefunden (Mopert et al. 2006). Wir vermuten, dass das CBG zur Freisetzung/Sekretion verarbeitet wird. Dies stimmt mit den bisherigen Beobachtungen überein, dass auch das SHBG in sekretorischen Vesikeln entlang der Herring-Körper mit OT co-lokalisiert ist (Herbert et al. 2003). Die Co-Lokalisation von CBG mit OT oder VP in Herring-Körpern wurde bereits in früheren Studien gezeigt.

Es ist bekannt, dass zentrale SHBG-Infusionen das weibliche Sexualverhalten verändern (Caldwell 2002, Caldwell et al. 2000). Aus der Art und Weise lässt sich schlussfolgern, dass das SHBG eine Rolle in der Steroidaktivierung des Gehirns

spielt. Daher kann vermutet werden, dass im Gehirn membranassoziierte SHBG-Rezeptoren existieren (Caldwell 2001, Caldwell 2002).

In den Arbeiten von Strel'chyonok und Avvakumov (Avvakumov et al. 1993, Strel'chyonok und Avvakumov 1991) ist eine CBG-Bindungsstelle auf der Zellmembran beschrieben. Nakhla et al. (1988) vermuteten, dass infolge der Stimulation eines membranassoziierten Rezeptors mit CBG über die intrazelluläre Adenylatcyclase cAMP als *second messenger* freigesetzt wird.

Beide Studien wurden mit peripherem Gewebe oder Zellen durchgeführt. Die Existenz eines CBG-Membranrezeptors konnte im Gehirn bis heute nicht nachgewiesen werden. Das Vorhandensein membranassoziiertes CBG-Rezeptoren, die zentrale Auswirkungen auf das Verhalten, inklusive der Stress-Antwort, vermitteln, ist jedoch denkbar. Diese Idee lag den während dieser Arbeit durchgeführten Immun-Co-Präzipitationsexperimenten zugrunde. Damit sollten mögliche CBG-Bindungspartner im untersuchten Material gefunden werden.

Im Kleinhirn wurde in den hier beschriebenen Experimenten ebenfalls CBG gefunden. (Beaumont 1985)beschrieb bereits 1985 die Existenz nukleärer GR im Kleinhirn, was darauf hindeutet, dass hier Glucocorticoide zur Wirkung kommen. In einem Teil der Purkinjezellen und in Nervenendfasern der Körnerzellschicht, bei denen es sich wahrscheinlich um Moosfasern handelt, war CBG-Immunfärbung möglich. CBG könnte eine Transmitter-Funktion, eventuell durch Wechselwirkungen mit dem *Liquor cerebrospinalis* (CSF), in der Kleinhirnrinde ausüben (Swinny et al. 2004).

CBG wurde im Rückenmark vereinzelt im Hinterhorn gefunden, was darauf hinweisen könnte, dass es eine Rolle in der Modifikation sensorischer Empfindungen spielt. Es konnte allerdings mit RT-PCR keine CBG-mRNA im Rückenmark nachgewiesen werden. Dies kann durch einen sehr niedrigen Expressionslevel oder die geringe Anzahl CBG-positiver Neurone im Rückenmark erklärt werden. Bedenkt man die wichtige Rolle der an die Neuroaxone anlagernden Corticosteroide bei der Behandlung von spinalem Schmerz und anderen Schmerzzuständen (Gordon 1980, Manchikanti 2002), ist es durchaus denkbar, dass CBG eine Rolle in der Schmerzempfindung auf Rückenmarksebene spielt.

Die vielen verschiedenen Lokalisationen des CBG im Ratten-ZNS deuten auf offensichtlich viele verschiedene Funktionen hin. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die

Eigenschaften des zentralen CBG die Funktion eines einfachen Glucocorticoid-Transporters im Serum übersteigen. CBG könnte im hypothalamo-neurohypophysären System als Neurohormon wirken und parakrin das neuronale Interstitium beeinflussen oder endokrin in die systemische Zirkulation freigesetzt werden. Auch könnte CBG in der *Eminentia mediana* als hypophysärer Faktor wirken und die Funktion der Releasing-Faktoren modulieren. Inwieweit aus dem HVL stammendes CBG als systemisches Hormon wirksam ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. CBG in extrahypothalamischen Regionen im Hippocampus könnte eine Funktion als Neurotransmittermodulator ausüben. Es könnte über den postulierten Rezeptor (Caldwell et al. 2003, Caldwell et al. 2006) an der bekannten nicht-genomischen, Membran-vermittelten ZNS-Wirkung von Glucocorticoiden beteiligt sein. Die zentrale Steuerung von Verhaltensweisen wie Flucht, Angst und Stress könnten ebenfalls mit der CBG-Signalübertragung verknüpft sein.

Lokalisation des CBGs in Gliazellen

In der Arbeit wurde CBG-Immunreaktivität in einer Teilklasse der Ependymzellen beobachtet. Bei diesen handelt es sich um ein einschichtiges Flimmerepithel, welches den dritten Ventrikel auskleidet und mit den Astrozyten verwandt ist. Phylogenetisch betrachtet gehören die Ependymzellen zu den ältesten Zellen des Neuralrohrs.

(Breuner und Orchinik 2002) konnten CBG-immunreaktive Zellen nachweisen, die den Hirnventrikel auskleiden. Sie vermuteten allerdings, dass das CBG aus dem Liquor aufgenommen wurde, um in den Zellen gespeichert und auf ein Signal hin wieder freigesetzt zu werden. Dies ist denkbar, da vom Liquor bekannt ist, dass es einen messbaren CBG-Spiegel beinhaltet (Predine et al. 1984, Schwarz und Pohl 1992). Diese Annahme wird durch das *In-Situ*-Hybridisierungs-Experiment von (Mopert et al. 2006) bestätigt, das keine CBG-mRNA in den Ependymzellen nachweisen konnte.

Die subependymalen magnozellularen Neurone des Hypothalamus enthielten immunhistochemisch nachweisbare, spezifische CBG-Produkte. Dies könnte ein Hinweis auf eine endogene CBG-Bildung in diesen Zellen sein. Es ist möglich, dass diese Neurone als eine Art „Liquor-Kontaktneurone“ fungieren und das CBG in den Liquor freisetzen (Jirikowski et al. 2007, Vigh et al. 1995, Vigh-Teichmann et al. 1971). Die funktionelle Bedeutung des Liquor-CBG ist bisher jedoch unbekannt. Allerdings

wurden bei Psychosen, z. B. bei Depressionen, im Liquor erhöhte Liquor-CBG-Spiegel festgestellt.

Weiter konnte in dieser Arbeit CBG in fast allen Epithelzellen des *Plexus choroideus* nachgewiesen werden. Sie stammen ebenfalls von der astrozytären Reihe ab. Mit RT-PCR konnte CBG-mRNA in den Homogenaten des Plexusepithels gefunden werden, was darauf hinweist, dass CBG im *Plexus choroideus* tatsächlich endogen gebildet wird. Es könnte sein, dass der *Plexus choroideus* auch eine Quelle für das CBG im Liquor darstellt.

In den untersuchten Gehirnschnitten konnten in anderen Gliazellen, wie fibrillären oder protoplastischen Astrozyten oder Oligodendrozyten, kein CBG angefärbt werden. Ebenso waren die Pituizyten des HHL oder die perivaskuläre Mikroglia stets CBG-negativ. Diese Befunde legen nahe, dass nur eine selektive Teilklasse der Gliazellen CBG exprimiert. Allerdings ist bekannt, dass Gliazellen auf eine Glucocorticoidbehandlung reagieren (Crossin et al. 1997, Nichols et al. 2005). Beispielsweise wird die Entwicklung von Markscheiden in Teilen der weißen Substanz des Schafshirns durch eine pränatale Behandlung mit GR-Agonisten dramatisch beeinflusst (Raschke et al. 2007). Klinische Studien haben gezeigt, dass eine Behandlung mit GR-Antagonisten im letzten Trimester einer Schwangerschaft zu Verhaltensauffälligkeiten und neurologischen Störungen der Kinder führen können. Glucocorticoide werden heute in kritischen Fällen vor der Geburt gegeben, um die Lungenreifung zu stimulieren.

Aufgrund der Tatsache, dass Oligodendrozyten und Astrozyten normalerweise nicht alle nukleäre GRs aufweisen (Jirikowski et al. 1993), aber deutlich GC-sensitiv sind, stellt sich nun die Frage nach dem zellulären molekularen Mechanismus. Die Behandlung von Hirnödemen und Blut-Hirn-Schrankenstörungen mit Glucocorticoiden beruht ebenfalls auf ihrer Wirkung auf/in die Gliazellen (Heiss et al. 1996). Um diesen Mechanismus näher zu untersuchen, wurde für die hier beschriebenen Untersuchungen die humane Glioblastom-Zelllinie 1321N1 verwendet.

6.2 CBG in glialen Zellkulturen

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 8.000 Menschen an Gehirntumoren (<http://www.krebsgesellschaft.de>). Die primären Tumore des Zentralnervensystems entstehen am häufigsten (etwa 50 %) aus der Glia, dem Stütz- und Nährgewebe der Nerven (siehe Kap. 2.1.1).

Im zweiten Teil der Arbeit wurden daher Untersuchungen speziell an Gliomzellkulturen, insbesondere der Astrozytom-Zelllinie 1321N1, durchgeführt.

1321N1-Zellen zeigten größtenteils eine spezifische CBG-Immunfärbung. Außerdem konnte mit RT-PCR die CBG-mRNA nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zelllinie 1321N1 in der Lage ist, CBG stabil zu exprimieren. Im Gegensatz dazu konnten CBG-Transkripte in den Gliom-Zelllinien A172, U373, SNB19, DBTRG und LN405 nicht detektiert werden. In der als Positivkontrolle verwendeten Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 konnten erwartungsgemäß größere Mengen CBG-mRNA und -Protein gefunden werden. Dies diente als Nachweis der Zuverlässigkeit der verwendeten Untersuchungsmethoden.

Aus Klonierungsexperimenten mit anschließender Sequenzanalyse von aus 1321N1-Zellen stammender CBG-mRNA konnte geschlossen werden, dass das in den Zellen gebildete Protein funktionell aktiv ist.

Mit Bindungsassays und Dot-Blot-Experimenten wurde zudem nachgewiesen, dass das CBG aus Homogenaten bzw. Immunpräzipitaten der Astrozytome in der Lage ist, Glucocorticoide (in diesen Experimenten Cortisol) zu binden. Dies kann als Beweis für die funktionelle Aktivität des *in vitro* exprimierten CBG angesehen werden.

Wenn man die Ergebnisse aus Bindungsassay und -Dot-Blot zusammen betrachtet, kann festgestellt werden, dass 1321N1-Zelllysate mehr markiertes Cortisol binden konnten als solche aus U373-Zellen. Mit RT-PCR konnte in allen Zelllinien die Expression von Glucocorticoidrezeptoren nachgewiesen werden. Dies dürfte der Grund dafür sein, dass CBG-freie U373-Zellen eine gewisse spezifische Bindungskapazität für Cortisol aufweisen. Da die GR-Expression in 1321N1 immunhistochemisch jedoch nicht in allen Zellen und in unterschiedlicher Ausprägung nachgewiesen werden konnte, können die Werte für 1321N1-Zellen wie folgt

interpretiert werden: Bis zu dem in U373 beobachteten Level der Cortisolbindung kommt diese an GRs zustande, darüber hinaus findet die Bindung an das in 1321N1 nachgewiesene CBG statt.

Durch Dialyse der Immunpräzipitate wurde versucht, alle, die Bindung von Hydrocortison beeinflussenden, niedermolekularen Substanzen zu entfernen. In der Dot-Blot-Untersuchung zeigte sich, dass die nach der Immunpräzipitation aufgereinigten CBGs aus 1321N1- und HepG2-Zellen HC zu binden vermögen; ein weiterer Nachweis für die funktionelle Aktivität von *in vitro* synthetisiertem CBG.

In der Therapie von Gehirntumoren haben Glucocorticoide einen festen Stellenwert. Man vermutete bisher, dass die GC-Wirkung über den klassischen Glucocorticoidrezeptor-Signalweg vermittelt wird. (Carroll et al. 1995) haben zwar die GR-mRNA in Astrozytomen nachgewiesen, was diese Theorie bestätigt, allerdings nicht immunhistochemisch die Lokalisation der GR in den einzelnen Zellen untersucht. Mit der Immunfärbung konnten in dieser Arbeit, ähnlich wie von (Jirikowski et al. 1993) *in vitro*, GR in Astrozyten nur vereinzelt im Kern und noch seltener im Zytoplasma oder in beiden nachgewiesen werden. Die GR-Färbung (DAB-Färbung) im Zytoplasma kommt entweder durch neu synthetisierte, noch inaktive Rezeptor-Moleküle zustande, könnte aber auch durch eine unspezifische Hintergrundfärbung bedingt sein. Letzteres bestätigte sich mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz.

GR α - und GR β -mRNA konnte jedoch in allen getesteten Zelllinien mit RT-PCR nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass selbst in einer Zellkultur, die ursprünglich aus identischen Zellen (Klonen) hervorgeht, vermutlich epi-/genetische Polymorphismen auftreten, sodass in der nun heterogenen Kultur Zellen mit unterschiedlichen Funktionen und in verschiedenen Differenzierungsstadien zu finden sind. Diese Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass die GC-Wirkung nicht ausschließlich über den GR vermittelt werden muss.

Es ist zu vermuten, dass CBG hier, wie in Kap. 2.2.1 beschrieben, in die intrazelluläre Signalübermittlung involviert ist. Die Wirkung der Glucocorticoide *in vitro* könnte somit wie *in vivo* über CBG und *second messenger* vermittelt werden und über einen direkten Weg nicht-genomische Effekte vermitteln (Rosner 1991, Nakhla et al. 1988).

Die Befunde der Co-Lokalisations-Experimente untermauerten die Hypothese, dass CBG in die Hormon-Signalübertragung verwickelt ist und dabei vielleicht sogar eine entscheidende Rolle spielt. Wie in Kap. 5.2.1 beschrieben, waren die Astrozytomzellen im Gegensatz zum GR-Status überwiegend CBG-positiv.

Bei stärkerer Vergrößerung ließ sich immunhistochemisch zusätzlich noch erkennen, dass das CBG in den Astrozytomzellen 1321N1 granulär – vesikulären Einschlüssen ähnelnd – erschien. Ähnliche Phänomene wurden auch in HepG2-Zellen beobachtet, was mit den bisherigen Erkenntnissen über die CBG-Freisetzung aus den Leberkarzinomzellen übereinstimmt (Khan et al. 1984, Mitrshahi et al. 2006). Es kann daher vermutet werden, dass es sich bei CBG aus 1321N1-Zellen ebenfalls um ein sekretorisches Protein handelt.

Es ist auch denkbar, dass das CBG nach der Freisetzung in Analogie zum Neurotransmitter-*Reuptake* in die Zellen wiederaufgenommen werden kann. Über das freigesetzte CBG könnte dann das extrazelluläre Cortisol z. B. via postuliertem membranassoziiertem Rezeptor eine intrazelluläre Wirkung entfalten (Strel'chyonok und Avvakumov 1991, Maitra et al. 1993, Rosner 1991, Singer et al. 1988). In der massenspektrometrischen Untersuchung konnte eine Überlappungsquote der Peptidfragmente für das von uns gereinigte gCBG von nur 8 % mit Einträgen für CBG in der internationalen NCBI Datenbank gefunden werden. Dies könnte durch eine „Verunreinigung“ mit *abundanten* Proteinen zu erklären sein (z. B. war Vimentin auch ein Bestandteil der Probe H2). Die Suche nach Interaktionspartnern in den restlichen Banden des SDS-PAGE lieferte eine Liste von Protein-Kandidaten, für die sich jedoch nach Literaturrecherchen keine Hinweise auf Interaktionen mit bereits bekannten Interaktionspartnern des CBG/HC/GR-Systems ergaben. Unter den Kandidaten-Proteinen konnte der gesuchte CBG-Rezeptor somit nicht identifiziert werden. Wahrscheinlich handelte es sich in einigen Fällen um unspezifische Bindungen von ubiquitär, in großer Menge vorkommenden (*abundanten*), Proteinen wie Actin und Tubulin. Da die Sequenzen nur eine maximal 40 %ige Überlappung zeigten, kann nicht mit ausreichender Sicherheit von einer korrekten Identifizierung der Proteine ausgegangen werden. Hierfür wäre eine weiterführende Untersuchung der Bindungskandidaten mit anderen Testsystemen, wie z. B. dem Hefe-Zwei-Hybrid-

Assay mit CBG-Klonen als Köder, nötig. So könnten Ergebnisse der hier durchgeführten MALDI-TOF-Untersuchungen neu bewertet werden.

6.3 Funktionelle Bedeutung von CBG in Zellkulturen

Die in Kap. 5.2.7 geäußerte Hypothese, dass das in den Gliomzellen gebildete CBG stimulusabhängig sezerniert werden kann, wurde mit zwei *In-Vitro*-Sekretionsexperimenten überprüft. Das CBG wurde im Überstand der Kulturmedien mittels Dot-Blot-Assay durch spezifische Antikörper-Bindung nachgewiesen. Die Ausschüttung wurde durch Hydrocortison stimuliert. Die hierbei ausgewählten Inkubationszeiträume von 24 bzw. 36 h sind für einen Sekretionsassay prinzipiell zu lang. Ursprüngliches Ziel des Experiments war eine Beobachtung potentieller Veränderungen von Zellzyklus und Überlebensfähigkeit der Zellen nach Behandlung mit Hydrocortison, Mifepriston und Dexamethason. Es gibt bereits einige Erkenntnisse über die Wirkung von Glucocorticoiden auf Tumorzellen. (Langeveld et al. 1992, Paoletti et al. 1990, Pinski et al. 1993, Zibera et al. 1992) wiesen proliferationsstimulierende Effekte der GC in Gliomen nach. (Das et al. 2004) und (Sur et al. 2005) beschrieben, dass eine Behandlung mit Dexamethason die Glioblastome U87MG und T98G vor mit Temozolomid induzierter Apoptose schützt. Im Gegensatz dazu berichteten McLean et al. (1986), (Gibelli et al. 1989, Kaup et al. 2001, McLean et al. 1986, Morita et al. 1999, Paoletti et al. 1990) von inhibitorischen Effekten der Glucocorticoide auf das Wachstum von Gliomen. (Morita et al. 1999) dokumentierte zudem pro-apoptotische Effekte von Dexamethason.

Aufgrund der kontroversen Datenlage sollten im Rahmen dieser Arbeit Erkenntnisse über die Wirkung von GC auf Gliomzellen in Abhängigkeit von CBG untersucht werden. Von SHBG ist bekannt, dass seine Bildung dosisabhängig durch Östrogene reguliert wird (Gao et al. 2003). Bei einer Behandlung mit niedrigen Östrogendosen konnte die genannte Arbeitsgruppe größere Mengen SHBG-mRNA in den Zellen nachweisen. Bei hohen war hingegen nur noch wenig SHBG-mRNA detektierbar. Eine analoge Regulation der CBG-Spiegel durch Cortisol ist denkbar.

Für den Nachweis einer Proteinsekretion reicht normalerweise eine Stimulation der Zellen im Minutenbereich aus, um einen Effekt zu erzielen. Ein solches Sekretionsexperiment, das spezifischer als das in dieser Arbeit beschriebene ist, ist momentan in Vorbereitung.

Nach Betrachtung der Kontrolle des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sekretionsexperiments konnte zunächst festgestellt werden, dass die Zellen unter normalen Bedingungen zur CBG-Freisetzung instande sind. Es findet also vermutlich eine permanente Basissekretion von CBG statt. Mit dem Dot-Blot-Assay konnte nach 6 und 24 h das CBG im Zell-Überstand nachgewiesen werden. Interessanterweise war nach 12 und 36 h deutlich weniger CBG im Überstand vorhanden. Da es sich bei CBG um ein sehr stabiles Protein handelt, kann eine Degradation nahezu ausgeschlossen werden. Es gibt zwei andere Erklärungsansätze für das beobachtete Phänomen: Zum einen ist ein enzymatischer Verdau denkbar (Proteasen aus Zellen oder Medium), zum anderen ist ein *Reuptake* von sezerniertem CBG denkbar (siehe Kap 6.2), wodurch es sich dem Nachweis im Überstand entzieht. Auch ein zyklischer Rhythmus könnte die Ursache sein. Allerdings kann hierzu aufgrund der Experimentdauer und der geringen Zahl von Messzeitpunkten keine sichere Aussage getroffen werden. Das geplante spezifischere Experiment könnte hier Klarheit bringen.

Besonders auffallend war, dass die CBG-Freisetzung nur durch Hydrocortison stimuliert werden konnte. Eine Behandlung mit dem GR-Antagonisten Mifepriston vermochte nicht, wie erwartet, die Freisetzung des CBG aus den Zellen zu hemmen. Es wurde im Gegenteil eher ein stimulierender Effekt festgestellt. Das Hydrocortison scheint die CBG-Freisetzung offenbar über einen nicht-genomischen Weg zu steuern, denn die Freisetzung fand auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Mifepriston (Blockade des genomischen Weges) statt. Dabei könnte ein membranassoziierter CBG-Rezeptor eine Rolle spielen (Khan et al. 1984, Maitra et al. 1993, Singer et al. 1988).

Dexamethason als Vertreter der synthetischen GR-Agonisten zeigte dagegen keinen Effekt auf die CBG-Freisetzung. Dies verwundert nicht, da es nur spezifisch über den nukleären GR wirkt und auch nicht von CBG gebunden wird. Die dargelegte Hypothese zur Regulation der CBG-Freisetzung über den nicht-genomischen Weg konnte somit bekräftigt werden. Allerdings ist zu beachten, dass eine Behandlung mit

Hydrocortison das Wachstum der Zellen innerhalb von 24 h positiv beeinflusst, während Dexamethason diesen Effekt nicht aufweist. So könnten sich Unterschiede der HC- und Dex-Behandlungen bezüglich der detektierten CBG-Menge rein aus Zellzahl-Unterschieden ergeben. Im Folgeexperiment ist daher eine Normalisierung der CBG-Menge auf die Zellzahl geplant.

In biologischen Modellen kann die Funktion einzelner Gene oder Proteine mithilfe gentechnischer Methoden gezielt untersucht werden. Mit den in Kap. 5.2.3 beschriebenen Klonierungsexperimenten ist es gelungen, ein hilfreiches „Laborwerkzeug“ herzustellen. Das Vektor-Konstrukt kann nun z. B. als Quelle zur Identifikation von zellulären CBG-Bindungspartnern mit einem Zwei-Hybrid-System oder zur Herstellung von rekombinantem CBG dienen.

Der *pIRES*-CBG-Vektor beinhaltet die vollständige CBG-Gensequenz und ist so konstruiert, dass er die Zellen nach erfolgreicher Transfektion zur Produktion von funktionell aktivem CBG zwingt. So sind weitere Experimente zur Identifizierung von CBG-Funktionen durchführbar.

In einem Vergleichsexperiment könnte eruiert werden, welche Wirkung das CBG bei Transfektion und Bildung in nativen CBG-freien Zellen ausübt. Es wäre von besonderem Interesse, herauszufinden, wie sich das Reaktionsverhalten transfizierter Zellen unter Cortisolbehandlung im Vergleich zu untransfizierten, CBG-freien Zellen verändert (Kontrolle: mit dem Leervektor transfizierte Zellen – *mock*-Transfektion). Dieses Verfahren ist in verschiedenen Zelltypen anwendbar und kann die Kenntnisse über die funktionelle Bedeutung des CBG deutlich erweitern.

7 Schlussfolgerung und klinischer Ausblick

Gliome sind eine sehr komplexe, heterogene und schwer behandelbare Erkrankung des ZNS. Als Standard-Therapieformen kommen operative Entfernung, Strahlenbehandlung und Chemotherapie zum Einsatz. Hierbei werden zur Verbesserung der Effektivität meist mehrere Therapiearten kombiniert (z. B. OP mit anschließender Strahlenbehandlung oder Bestrahlung mit zusätzlicher Chemotherapie). Allerdings sind alle genannten Therapieansätze selbst limitierend. Die begrenzenden Faktoren sind einerseits sich entwickelnde Resistenzen und andererseits der diffus infiltrierende Charakter des Tumors. Zurzeit sind neue Therapieoptionen auf molekularer und zellbiologischer Ebene, wie z. B. Gentherapie, Immuntherapie, rezeptorgesteuerte Toxintherapie und Signaltransduktionsblockaden, in der Erprobung. Diese Ansätze befinden sich aber alle noch in einer frühen Testphase.

Bei der Behandlung von Gehirntumoren gehören Glucocorticoide (GC) zu den Standardtherapeutika. Man verwendet sie in erster Linie zur Kontrolle des vasogenen Hirnödems (Bernard-Weil und David 1963) sowie zur Entzündungshemmung. Die Wirkung von GC auf die Tumorproliferation wird kontrovers diskutiert. Insgesamt senken die GC aber Morbidität und Mortalität. Über welche Mechanismen diese positiven Effekte vermittelt werden, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt.

Bei einem primären Hirntumor entstehen, durch sein raumforderndes Wachstum, fast immer Ödeme. Diese tumorassoziierten Hirnödeme haben aufgrund der begrenzten Volumenkapazität des Schädels meist einen intrakraniellen Druckanstieg zur Folge, welcher sich auf das klinische Krankheitsbild des Patienten sehr negativ auswirkt. GC können die Permeabilität des kapillaren Gefäßbetts innerhalb des Tumors senken und so dem Ödem entgegenwirken (Heiss et al. 1996, Jarden et al. 1989, Sinha et al. 2004, Torok et al. 2003).

Es ist wahrscheinlich, dass die bekannten schnellen Glucocorticoidwirkungen im ZNS nicht über den klassischen genomischen Weg, also via Kernrezeptoren, sondern über CBG und einen postulierten membranassoziierten Rezeptor vermittelt werden. Ähnliches wurde für periphere Organe bereits gezeigt (Maitra et al. 1993, Rosner 1991, Singer et al. 1988).

Schlussfolgerung und klinischer Ausblick

In der Klinik gehören Glucocorticoide zwar zur präoperativen Standardtherapie der Tumorbehandlung, allerdings ist auch bekannt, dass Tumore mitunter gar nicht oder nur eingeschränkt auf Cortisol ansprechen. Unsere Vermutung ist, dass die Cortisol-Empfindlichkeit eines Tumors mit der Fähigkeit zur Synthese von Corticosteroid-bindendem Globulin (CBG) zusammenhängt.

Das am häufigsten eingesetzte, synthetische Glucocorticoid Dexamethason besitzt die 30fache Wirkpotenz von Cortisol (syn. Hydrocortison). Diese beruht auf strukturellen Veränderungen der Molekülstruktur im Vergleich zu Cortisol, die auch eine deutliche Verlängerung der Plasmahalbwertszeit zur Folge haben.

Wie weitere Ergebnisse zeigen, stimuliert eine Behandlung mit Cortisol die CBG-Freisetzung. Es ist denkbar, dass durch die GC-Behandlung die CBG-Expression, wie für Östrogene und SHBG bereits bekannt, stimuliert werden kann. Das CBG könnte neben seiner bekannten Transporterfunktion auch eine Art Puffer für frei zirkulierende Glucocorticoide darstellen und somit bei Erhöhung des Serumcortisol-Spiegels freigesetzt werden. Es ist ebenfalls denkbar, dass der Glucocorticoid-CBG-Komplex als Ligand über einen postulierten Membranrezeptor auf die Zelle zurückwirkt und so die schnellen nicht-genomischen/klinischen Effekte vermittelt. Durch eine Dexamethason-Behandlung würde dieser Signalweg allerdings nicht aktiviert werden, da die Verbindung nur via nukleäre Rezeptoren zur Wirkung kommen kann. Darum sollte es in Erwägung gezogen werden, modifizierte natürliche Corticosteroide, die auch nicht-genomische Effekte hervorrufen können, in der Therapie von Gehirntumoren einzusetzen.

Letztendlich ist es sehr wahrscheinlich, dass die bindenden Globuline (BGs) eine viel wichtigere Rolle im Organismus spielen als bisher angenommen. Mithilfe der Ergebnisse unserer und der folgenden Forschung könnte die Rolle des CBG im Organismus grundlegend überdacht werden.

8 Literaturverzeichnis

- Agnati LF, Fuxe K, Yu ZY, Harfstrand A, Okret S, Wikstrom AC, Goldstein M, Zoli M, Vale W, Gustafsson JA. 1985. Morphometrical analysis of the distribution of corticotrophin releasing factor, glucocorticoid receptor and phenylethanolamine-N-methyltransferase immunoreactive structures in the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat. *Neurosci Lett*, 54 (2-3):147-152.
- Armelin HA. 1973. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70 (9):2702-2706.
- Avvakumov GV, Warmels-Rodenhiser S, Hammond GL. 1993. Glycosylation of human corticosteroid-binding globulin at asparagine 238 is necessary for steroid binding. *J Biol Chem*, 268 (2):862-866.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev*, 17 (3):245-261.
- Beato M, Herrlich P, Schutz G. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, 83 (6):851-857.
- Beaumont K. 1985. Rat C6 glioma cells contain type I as well as type II corticosteroid receptors. *Brain Res*, 342 (2):252-258.
- Beishuizen A, Thijs LG, Vermes I. 2001. Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma. *Intensive Care Med*, 27 (10):1584-1591.
- Berdusco ET, Yang K, Hammond GL, Challis JR. 1995. Corticosteroid-binding globulin (CBG) production by hepatic and extra-hepatic sites in the ovine fetus; effects of CBG on glucocorticoid negative feedback on pituitary cells in vitro. *J Endocrinol*, 146 (1):121-130.
- Bernard-Weil E, David M. 1963. Preoperative Hormonal Treatment in Cases of Cerebral Tumor. *J Neurosurg*, 20:841-848.
- Breuner CW, Orchinik M. 2002. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol*, 175 (1):99-112.

- Breuner CW, Lynn SE, Julian GE, Cornelius JM, Heidinger BJ, Love OP, Sprague RS, Wada H, Whitman BA. 2006. Plasma-binding globulins and acute stress response. *Horm Metab Res*, 38 (4):260-268.
- Caldwell JD. 2001. Evidence of sex hormone binding globulin binding sites in the medial preoptic area and hypothalamus. *Horm Metab Res*, 33 (1):7-9.
- Caldwell JD. 2002. A sexual arousability model involving steroid effects at the plasma membrane. *Neurosci Biobehav Rev*, 26 (1):13-30.
- Caldwell JD, Moe BD, Hoang J, Nguyen T. 2000. Sex hormone binding globulin stimulates female sexual receptivity. *Brain Res*, 874 (1):24-29.
- Caldwell JD, Song Y, Englof I, Hofle S, Key M, Morris M. 2003. 5alpha-Reduced androgens block estradiol-BSA-stimulated release of oxytocin. *Brain Res*, 976 (2):259-261.
- Caldwell JD, Suleman F, Chou SH, Shapiro RA, Herbert Z, Jirikowski GF. 2006. Emerging roles of steroid-binding globulins. *Horm Metab Res*, 38 (4):206-218.
- Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM. 1995. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery*, 37 (3):496-503; discussion 503-494.
- Cowan RA, Cowan SK, Giles CA, Grant JK. 1976. Prostatic distribution of sex hormone-binding globulin and cortisol-binding globulin in benign hyperplasia. *J Endocrinol*, 71 (1):121-131.
- Crossin KL, Tai MH, Krushel LA, Mauro VP, Edelman GM. 1997. Glucocorticoid receptor pathways are involved in the inhibition of astrocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (6):2687-2692.
- Dallman MF. 2005. Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future. *Front Neuroendocrinol*, 26 (3-4):103-108.
- Das A, Banik NL, Patel SJ, Ray SK. 2004. Dexamethasone protected human glioblastoma U87MG cells from temozolomide induced apoptosis by maintaining Bax:Bcl-2 ratio and preventing proteolytic activities. *Mol Cancer*, 3 (1):36.
- de Kloet ER, Voorhuis TA, Leunissen JL, Koch B. 1984. Intracellular CBG-like molecules in the rat pituitary. *J Steroid Biochem*, 20 (1):367-371.

- del Mar Grasa M, Cabot C, Adan C, de Matteis R, Esteve M, Cinti S, Fernandez JA, Lopez, Remesar X, Alemany A. 2001. Corticosteroid-binding globulin synthesis and distribution in rat white adipose tissue. *Mol Cell Biochem*, 228 (1-2):25-31.
- DeMoor PM, E.; Hendrikx, A.; Heyns, W.; Vandenschrieck, H. G. 1967. Cortisol-binding capacity of plasma transcortin: a sex-linked trait? *J Clin Endocr*, 27:959-965.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci*, 23 (12):4850-4857.
- Doe RPL, F. N.; Seal, U. S. 1965. Familial decrease in corticosteroid-binding globulin. *Metabolism*, 14:940-943.
- Emptoz-Bonneton A, Cousin P, Seguchi K, Avvakumov GV, Bully C, Hammond GL, Pugeat M. 2000. Novel human corticosteroid-binding globulin variant with low cortisol-binding affinity. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (1):361-367.
- Engelmann M, Wotjak CT, Ebner K, Landgraf R. 2000. Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. *Exp Physiol*, 85 Spec No:125S-130S.
- Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. 2005. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol*, 15 (4):297-310.
- Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P, Soloff MS, Fernstrom MJ. 1982. Oxytocin receptors and human parturition: a dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science*, 215 (4538):1396-1398.
- Gao G, Herbert Z, Kong J, Gabrielson N, Mautz A, Wu D, Jirikowski GF, Caldwell JD. 2003. Estradiol control of expression and levels of estradiol-binding proteins in the medial preoptic area, medial hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology*, 78 (2):61-71.
- Gibelli N, Zibera C, Butti G, Assietti R, Sica G, Scerrati M, Iacopino F, Roselli R, Paoletti P, Robustelli della Cuna G, et al. 1989. Hormonal modulation of brain tumour growth: a cell culture study. *Acta Neurochir (Wien)*, 101 (3-4):129-133.
- Gordon J. 1980. Caudal extradural injection for the treatment of low back pain. *Anaesthesia*, 35 (5):515-516.

- Gould E. 1994. The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Ann N Y Acad Sci*, 743:73-92; discussion 92-73.
- Greten H. 2005. *Innere Medizin*. 12 Aufl. Thieme Verlag.
- Gupta R, Brunak S. 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput*:310-322.
- Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC, Hsieh CM, Chui DS, Thomas KL, Prorock AJ, Laubach VE, Moskowitz MA, French BA, Ley K, Liao JK. 2002. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*, 8 (5):473-479.
- Hammond GL, Smith CL, Underhill DA. 1991. Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40 (4-6):755-762.
- Heiss JD, Papavassiliou E, Merrill MJ, Nieman L, Knightly JJ, Walbridge S, Edwards NA, Oldfield EH. 1996. Mechanism of dexamethasone suppression of brain tumor-associated vascular permeability in rats. Involvement of the glucocorticoid receptor and vascular permeability factor. *J Clin Invest*, 98 (6):1400-1408.
- Herbert Z, Jirikowski GF, Petrusz P, Englof I, Caldwell JD. 2003. Distribution of androgen-binding protein in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system, co-localization with oxytocin. *Brain Res*, 992 (2):151-158.
- Herbert Z, Pollak E, Molnar L, Caldwell JD, Jirikowski GF. 2006. Co-transport of sex hormone-binding globulin/SHBG with oxytocin in transport vesicles of the hypothalamo-hypophyseal system. *Horm Metab Res*, 38 (4):291-293.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*, 24 (3):151-180.
- Holbrook NJ, Grasso RJ, Hackney JF. 1981. Glucocorticoid receptor properties and glucocorticoid regulation of glutamine synthetase activity in sensitive C6 and resistant C6H glial cells. *J Neurosci Res*, 6 (1):75-88.

- Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. 1986. Specific binding of human corticosteroid-binding globulin to cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (10):3253-3256.
- Inoue T, Akahira J, Suzuki T, Darnel AD, Kaneko C, Takahashi K, Hatori M, Shirane R, Kumabe T, Kurokawa Y, Satomi S, Sasano H. 2002. Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 87 (11):5325-5331.
- Jarden JO, Dhawan V, Moeller JR, Strother SC, Rottenberg DA. 1989. The time course of steroid action on blood-to-brain and blood-to-tumor transport of ^{82}Rb : a positron emission tomographic study. *Ann Neurol*, 25 (3):239-245.
- Jirikowski GF, Caldwell JD, Pedersen CA, Stumpf WE. 1988. Estradiol influences oxytocin-immunoreactive brain systems. *Neuroscience*, 25 (1):237-248.
- Jirikowski GF, McGimsey WC, Caldwell JD, Sar M. 1993. Distribution of oxytocinergic glucocorticoid target neurons in the rat hypothalamus. *Horm Metab Res*, 25 (10):543-544.
- Jirikowski GF, Pusch L, Mopert B, Herbert Z, Caldwell JD. 2007. Expression of corticosteroid binding globulin in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat*, 34 (1-2):22-28.
- Karszen AM, Meijer, O.C., van der Sandt, IC, Lucassen, PJ, de Lange, EC dBA, de Kloet ER. 2001. Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology*, 142:2686–2694.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joels M. 2005. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (52):19204-19207.
- Kaup B, Schindler I, Knupfer H, Schlenzka A, Preiss R, Knupfer MM. 2001. Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *J Neurooncol*, 51 (2):105-110.
- Kent WJ. 2002. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*, 12 (4):656-664.
- Khan MS, Aden D, Rosner W. 1984. Human corticosteroid binding globulin is secreted by a hepatoma-derived cell line. *J Steroid Biochem*, 20 (2):677-678.

- Klegeris A WD, McGeer PL. 1997. Regulation of glutamate in cultures of human monocytic THP-1 and astrocytoma U-373 MG cells. *J Neuroimmunol*, 78. (1-2):152-161.
- Kumar S, Sachar K, Huber J, Weingarten DP, de Vellis J. 1985. Glucocorticoids regulate the transcription of glycerol phosphate dehydrogenase in cultured glial cells. *J Biol Chem*, 260 (27):14743-14747.
- Langeveld CH, van Waas MP, Stoof JC, Sutanto W, de Kloet ER, Wolbers JG, Heimans JJ. 1992. Implication of glucocorticoid receptors in the stimulation of human glioma cell proliferation by dexamethasone. *J Neurosci Res*, 31 (3):524-531.
- Lewis JG, Lewis MG, Elder PA. 2003. An enzyme-linked immunosorbent assay for corticosteroid-binding globulin using monoclonal and polyclonal antibodies: decline in CBG following synthetic ACTH. *Clin Chim Acta*, 328 (1-2):121-128.
- Lohrenz FD, R. P.; Seal, U. S. 1968. Idiopathic or genetic elevation of corticosteroid-binding globulin? *J Clin Endocr*, 28:1073-1075.
- Ma XM, Levy A, Lightman SL. 1997. Emergence of an isolated arginine vasopressin (AVP) response to stress after repeated restraint: a study of both AVP and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (RNA) and heteronuclear RNA. *Endocrinology*, 138 (10):4351-4357.
- Maitra US, Khan MS, Rosner W. 1993. Corticosteroid-binding globulin receptor of the rat hepatic membrane: solubilization, partial characterization, and the effect of steroids on binding. *Endocrinology*, 133 (4):1817-1822.
- Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW. 1995. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology*, 136 (10):4517-4525.
- Manchikanti L. 2002. Role of neuraxial steroids in interventional pain management. *Pain Physician*, 5 (2):182-199.
- McKay LI, Cidlowski JA. 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*, 20 (4):435-459.

- McLean JS, Frame MC, Freshney RI, Vaughan PF, Mackie AE, Singer I. 1986. Phenotypic modification of human glioma and non-small cell lung carcinoma by glucocorticoids and other agents. *Anticancer Res*, 6 (5):1101-1106.
- Mihirshahi R, Lewis JG, Ali SO. 2006. Hormonal effects on the secretion and glycoform profile of corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 101 (4-5):275-285.
- Misao R, Nakanishi Y, Fujimoto J, Tamaya T. 1998. Effects of sex steroid hormones on corticosteroid-binding globulin gene expression in human endometrial cancer cell line Ishikawa. *Ann Clin Biochem*, 35 (Pt 5):637-642.
- Miska W, Pena P, Villegas J, Sanchez R. 2004. Detection of a CBG-like protein in human Fallopian tube tissue. *Andrologia*, 36 (1):41-46.
- Mopert B, Herbert Z, Caldwell JD, Jirikowski GF. 2006. Expression of corticosterone-binding globulin in the rat hypothalamus. *Horm Metab Res*, 38 (4):246-252.
- Morita K, Ishimura K, Tsuruo Y, Wong DL. 1999. Dexamethasone enhances serum deprivation-induced necrotic death of rat C6 glioma cells through activation of glucocorticoid receptors. *Brain Res*, 816 (2):309-316.
- Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, Matsushima K. 1994. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem*, 269 (18):13289-13295.
- Nakhla AM, Khan MS, Rosner W. 1988. Induction of adenylate cyclase in a mammary carcinoma cell line by human corticosteroid-binding globulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 153 (3):1012-1018.
- Ni Chonghaile T, Concannon CG, Szegezdi E, Gorman AM, Samali A. 2006. Dexamethasone inhibits apoptosis in C6 glioma cells through increased expression of Bcl-XL. *Apoptosis*, 11 (7):1247-1255.
- Nichols NR, Agolley D, Zieba M, Bye N. 2005. Glucocorticoid regulation of glial responses during hippocampal neurodegeneration and regeneration. *Brain Res Brain Res Rev*, 48 (2):287-301.
- Orchinik M, Hastings N, Witt D, McEwen BS. 1997. High-affinity binding of corticosterone to mammalian neuronal membranes: possible role of corticosteroid binding globulin. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 60 (3-4):229-236.

- Paoletti P, Butti G, Zibera C, Scerrati M, Gibelli N, Roselli R, Magrassi L, Sica G, Rossi G, Robustelli della Cuna G. 1990. Characteristics and biological role of steroid hormone receptors in neuroepithelial tumors. *J Neurosurg*, 73 (5):736-742.
- Paxinos G, Watson C. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Atlas*. Second Aufl. San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto: Academic Press, Inc.
- Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, Brasen JH, Schulz H, Gross V, Grone HJ, Nykjaer A, Willnow TE. 2006. Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin. *Mol Cell Biol*, 26 (19):7236-7245.
- Pinski J, Halmos G, Shirahige Y, Wittliff JL, Schally AV. 1993. Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. *J Clin Endocrinol Metab*, 77 (5):1388-1392.
- Predine J, Brailly S, Delaporte P, Milgrom E. 1984. Protein binding of cortisol in human cerebrospinal fluid. *J Clin Endocrinol Metab*, 58 (1):6-11.
- Raschke C, Schmidt S, Schwab M, Jirikowski GF. 2007. Effects of betamethasone treatment on central myelination in fetal sheep: an electron microscopical study. *Anat Histol Embryol*, in press.
- Robe PA, Nguyen-Khac M, Jolois O, Rogister B, Merville MP, Bours V. 2005. Dexamethasone inhibits the HSV-tk/ ganciclovir bystander effect in malignant glioma cells. *BMC Cancer*, 5 (1):32.
- Rosner W. 1991. Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 20 (4):697-720.
- Schwarz S, Pohl P. 1992. Steroid hormones and steroid hormone binding globulins in cerebrospinal fluid studied in individuals with intact and with disturbed blood-cerebrospinal fluid barrier. *Neuroendocrinology*, 55 (2):174-182.
- Scrocchi LA, Hearn SA, Han VK, Hammond GL. 1993. Corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the mouse liver and kidney during postnatal development. *Endocrinology*, 132 (2):910-916.

- Sengupta S, Vonesch JL, Waltzinger C, Zheng H, Wasyluk B. 2000. Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *Embo J*, 19 (22):6051-6064.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68 (5):850-858.
- Singer CJ, Khan MS, Rosner W. 1988. Characteristics of the binding of corticosteroid-binding globulin to rat cell membranes. *Endocrinology*, 122 (1):89-96.
- Sinha S, Bastin ME, Wardlaw JM, Armitage PA, Whittle IR. 2004. Effects of dexamethasone on peritumoural oedematous brain: a DT-MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75 (11):1632-1635.
- Sipos EP, Brem H. 2000. Local anti-angiogenic brain tumor therapies. *J Neurooncol*, 50 (1-2):181-188.
- Sivukhina EV, Jirikowski GF, Bernstein HG, Lewis JG, Herbert Z. 2006. Expression of corticosteroid-binding protein in the human hypothalamus, co-localization with oxytocin and vasopressin. *Horm Metab Res*, 38 (4):253-259.
- Smith CL, Hammond GL. 1992. Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat. *Endocrinology*, 130 (4):2245-2251.
- Strel'chyonok OA, Avvakumov GV. 1991. Interaction of human CBG with cell membranes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40 (4-6):795-803.
- Stummer W. 2007. Mechanisms of tumor-related brain edema. *Neurosurg Focus*, 22 (5):E8.
- Sur P, Sribnick EA, Patel SJ, Ray SK, Banik NL. 2005. Dexamethasone decreases temozolomide-induced apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Glia*, 50 (2):160-167.
- Swanson LW, Simmons DM. 1989. Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol*, 285 (4):413-435.
- Swinny JD, Metzger F, J IJ-P, Gounko NV, Gramsbergen A, van der Want JJ. 2004. Corticotropin-releasing factor and urocortin differentially modulate rat Purkinje cell dendritic outgrowth and differentiation in vitro. *Eur J Neurosci*, 19 (7):1749-1758.

- Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M. 2001. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med*, 7 (9):1010-1015.
- Torok M, Huwyler J, Gutmann H, Fricker G, Drewe J. 2003. Modulation of transendothelial permeability and expression of ATP-binding cassette transporters in cultured brain capillary endothelial cells by astrocytic factors and cell-culture conditions. *Exp Brain Res*, 153 (3):356-365.
- Torpy DJ, Ho JT. 2007. Corticosteroid-binding globulin gene polymorphisms: clinical implications and links to idiopathic chronic fatigue disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 67 (2):161-167.
- Torpy DJ, Bachmann AW, Grice JE, Fitzgerald SP, Phillips PJ, Whitworth JA, Jackson RV. 2001. Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (8):3692-3700.
- Underhill DAH, G. L. 1989. Organization of the human corticosteroid binding globulin gene and analysis of its 5-prime-flanking region. *Molec Endocr*, 3:1448-1454.
- Vedoy CG, Sogayar MC. 2002. Isolation and characterization of genes associated with the anti-tumor activity of glucocorticoids. *Brain Res Mol Brain Res*, 106 (1-2):57-69.
- Viau V, Sharma S, Meaney MJ. 1996. Changes in plasma adrenocorticotropin, corticosterone, corticosteroid-binding globulin, and hippocampal glucocorticoid receptor occupancy/translocation in rat pups in response to stress. *J Neuroendocrinol*, 8 (1):1-8.
- Vigh-Teichmann I, Vigh B, Aros B. 1971. [Liquor contact neurons in the nucleus infundibularis of the chick]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 112 (2):188-200.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I, Debreceni K, Takacs J. 1995. Similar fine structural localization of immunoreactive glutamate in the frog pineal complex and retina. *Arch Histol Cytol*, 58 (1):37-44.
- Webster JC, Huber RM, Hanson RL, Collier PM, Haws TF, Mills JK, Burn TC, Allegretto EA. 2002. Dexamethasone and tumor necrosis factor-alpha act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology*, 143 (10):3866-3874.
- Westphal U. 1971. Steroid-protein interactions. *Monogr Endocrinol*, 4:1-567.

- Zhang C, Beckermann B, Kallifatidis G, Liu Z, Rittgen W, Edler L, Buchler P, Debatin KM, Buchler MW, Friess H, Herr I. 2006. Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *Int J Oncol*, 29 (5):1295-1301.
- Zibera C, Gibelli N, Butti G, Pedrazzoli P, Carbone M, Magrassi L, Robustelli della Cuna G. 1992. Proliferative effect of dexamethasone on a human glioblastoma cell line (HU 197) is mediated by glucocorticoid receptors. *Anticancer Res*, 12 (5):1571-1574.
- Zschocke J, Bayatti N, Clement AM, Witan H, Figiel M, Engele J, Behl C. 2005. Differential promotion of glutamate transporter expression and function by glucocorticoids in astrocytes from various brain regions. *J Biol Chem*, 280 (41):34924-34932.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Prof. Dr. G.F. Jirikowski danken wir für die Überlassung der Themen und die vielseitige Unterstützung, die er uns zukommen ließ.

Besonders bedanken möchten wir uns bei Dr. Friedemann Gaube für seine Hilfe beim Korrekturlesen.

Ganz herzlich danken möchten wir Dr. Torsten C. Kroll, Dr. dent. Monika Uhl, Dr. med. Bernd F.M. Romeike, Dipl.-Ing. Harald Wegmann und allen Freunden, die uns mit der kritischen Durchsicht des Manuskriptes sehr unterstützt haben.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Eltern, Harald und Dagmar Wegmann, meinem Bruder, Marc, Alexander Uhl, Saskia Wunderlich und Florian Wendt für ihre fortwährende Unterstützung. Danke, dass ihr mich immer wieder motiviert habt, weiter zu machen und nicht aufzugeben.

Ganz herzlich möchte ich meiner Tochter Katja danken, für dein Verständnis, dass ich so wenig Zeit während der Doktorarbeit für dich hatte.

Wir danken der technischen Assistentin des Instituts für Anatomie II, FSU Jena, R. Kasch, denn ohne Ihre ständigen Bemühungen wäre ein Funktionieren des Labors nicht möglich gewesen.

Wir danken Frau Dr. M. Soom, Abteilung für molekulare und zelluläre Biophysik, FSU Jena, für die tolle Unterstützung bei unseren aufwändigen Sequenzierungen.

Wir möchten uns bei dem Institut für Biochemie, FSU Jena, insbesondere bei der Arbeitsgruppe von Frau Rohde dafür bedanken, dass wir ihre Geräte mitbenutzen durften. Aus demselben Grund wollen wir uns ebenfalls bei dem Institut für Immunologie, FSU-Jena, und dem Institut für Biomolekulare Chemie des Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology Jena bedanken.

Wir danken unseren Kollegen für die gute Arbeitsatmosphäre und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Bei der vorliegenden Doktorarbeit handelt es sich um eine Doppeldissertation, da die Ergebnisse zusammenhängen und sich gegenseitig sinnvoll ergänzen.

Von Larissa Pusch wurden die *In-Vivo*-Experimente an den Rattengehirnen zum morphologischen und biochemischen Nachweis von CBG durchgeführt. Ebenso war sie für die Proteinanalyse und die Klonierungsexperimente zuständig.

Sonja Wegmann war für den morphologischen und biochemischen Nachweis des CBG *in vitro* verantwortlich. Zusätzlich führte sie die Sekretionsexperimente an den Zellkulturen und den funktionellen Aktivitätsnachweis des *in vitro* gefundenen CBG durch.

Hiermit erklären wir, dass uns die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

dass wir die Dissertation selbst angefertigt haben und alle von uns benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in unserer Arbeit angegeben sind, dass uns folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. habil. G. F. Jirikowski,

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von uns für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass wir die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht haben,

dass wir die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht haben.

Ort, Datum

Unterschriften der Verfasser