

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Apothekerin Miriam Weber

aus Eppelheim

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2007

Molekulare Mechanismen der Aldosteron- Wirkung und Interaktionen des Mineralocorticoid-Rezeptors in Nierenzellen

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wieland
Prof. Dr. Ulrich Hilgenfeldt

Für meine Eltern und André

VORWORT

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie, Abteilung klinische Pharmakologie, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Thomas Wieland danke ich sehr herzlich für die Aufnahme am Institut und wissenschaftliche Unterstützung sowie für seine offene und konstruktive Kritik.

Herrn Dr. Ralf Lösel möchte ich für die Betreuung und fachliche Förderung danken, außerdem für seine zahlreichen Ratschläge zu Fragen und Problemen.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Hilgenfeldt für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anika Hartz und Herrn Dr. Björn Bauer, deren persönlicher und fachlicher Rat mir stets eine große Hilfe war, sowie Frau Irene Rupprecht für das Korrekturlesen.

Für die Möglichkeit zur Durchführung der Ussingkammer-Versuche und seine wertvollen Ratschläge möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Heimo Mairbörl bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank meinen ehemaligen Kolleginnen Martina Seyfert, Elke Kirsch und Sabine Braun für die gute Zusammenarbeit im Labor und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

ZUSAMMENFASSUNG

Miriam Weber, Apothekerin

Molekulare Mechanismen der Aldosteron-Wirkung und Interaktionen des Mineralocorticoid-Rezeptors in Nierenzellen

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wieland, Prof. Dr. Ulrich Hilgenfeldt

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Interaktionen des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR) sowie Regulationsmechanismen des MR durch Aldosteron in Nierenzellen untersucht werden.

In früheren Versuchen am Institut für Klinische Pharmakologie Mannheim wurde die schnelle (2h) Aldosteron-induzierte Genexpression in Zellen des distalen Tubulusepithels (DTEC) untersucht. Unter den in einem Mikroarray differentiell regulierten Genen wurden mehrere Proteine ausgewählt, deren Einfluss auf MR-Signalwege näher untersucht werden sollte. Es stellte sich heraus, dass die Eigenschaften unterschiedlicher Isolate der primären DTEC so stark variierten, dass keine signifikanten Resultate erreicht werden konnten. Auf die weitere Verwendung dieser Zellen wurde deshalb verzichtet.

Untersuchungen an Steroidrezeptoren haben gezeigt, dass Kofaktoren eine wichtige Rolle für die Wirkung von Steroiden spielen. Auch für die Wirkung von Steroiden am MR haben solche Protein-Protein-Interaktionen sehr wahrscheinlich eine entscheidende Bedeutung. Während die Rekrutierung von Kofaktoren für die meisten Steroidrezeptoren gut untersucht ist, ist für den MR hierüber noch wenig bekannt.

Mögliche Interaktionspartner des MR sollten daher mittels Affinitätschromatographie und anschließender massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden. Hierfür wurden parallel verschiedene Systeme untersucht. Die höchsten Ausbeuten an Zielprotein, bei einem niedrigen Hintergrund an unspezifisch gebundenen Proteinen, lieferte ein System mit einer Streptavidin-Affinitätssequenz. Dieses wurde für alle Versuche im Großmaßstab eingesetzt.

Es wurden zahlreiche Proteine identifiziert, die sich mit dem zytosolischen MR in einem Komplex befinden, darunter alle in der Literatur bereits beschriebenen. Die Komplexbestandteile können in folgende Gruppen eingeteilt werden:

1. Hitzeschockproteine/Chaperone
2. Proteine des intrazellulären Transportapparates
3. Metabolische Enzyme
4. Elongationsfaktoren
5. Sonstige

Die relativ große Anzahl an isolierten Proteinen weist auf die Bildung von MR-Multiproteinkomplexen hin, wie dies bereits für den Glucocorticoid-Rezeptor gezeigt wurde. Zu den identifizierten Proteinen gehören bereits gut dokumentierte Interaktionen des MR (Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90, Aktin, Tubulin), als auch bislang noch nicht für den MR, jedoch für andere Steroidrezeptoren beschriebene Interaktionspartner (p23, 14-3-3 ϵ , GRP78, Elongationsfaktoren eEF1 und eEF2). Daneben wurden zahlreiche neue Proteine im MR-Komplex identifiziert.

Um die differentiellen Wirkungen unterschiedlicher MR-Liganden zu verstehen, wurde die Liganden-abhängige Rekrutierung von Kofaktoren untersucht. In Gegenwart des Agonisten Aldosteron waren HSPs zu verschiedenen Zeitpunkten erwartungsgemäß in deutlich geringerer Menge an den zytosolischen MR gebunden als im unstimulierten Zustand. Außerdem wurden zwei Proteine identifiziert, die abhängig vom gebundenen Liganden im MR-Komplex gefunden wurden. GRP78 und β -Propionyl-CoA-carboxylase Vorläufermolekül wurden beim unstimulierten MR wie auch nach einer Stimulation mit Aldosteron isoliert, jedoch nicht mehr nach einer Inkubation mit Spironolacton. Diese Befunde könnten auf eine bisher unerkannte Komplexität der Wirkung von MR Antagonisten hindeuten.

ABSTRACT

Miriam Weber, Pharmacist

Molecular mechanism of aldosterone effects and interactions of the mineralocorticoid receptor in kidney cells

Referees Prof. Dr. Thomas Wieland, Prof. Dr. Ulrich Hilgenfeldt

Within the scope of this project, interactions of mineralocorticoid receptor (MR) as well as regulatory mechanisms of MR induced by aldosterone should be examined.

In earlier experiments at the Department of Clinical Pharmacology Mannheim, the early (2h) aldosterone induced gene expression in distal tubular cells (DTEC) was investigated. Among the genes differentially regulated by aldosterone in a microarray experiment, several proteins were selected, of which the influence on MR signalling pathways was to be analysed. However the properties of individual cell preparations of primary DTECs turned out to vary to an extent that no significant results could be achieved. The further use of these cells was abandoned.

Studies on steroid receptors have shown that cofactors play an important role for the effects of steroids. Such protein-protein-interactions are likely to be important for the effects of steroids on the mineralocorticoid receptor (MR) as well. Whereas the recruitment of cofactors has been studied in detail for most steroid receptors, little is known in the context of MR. Thus, possible interaction partners of MR should be identified by affinity chromatography followed by mass spectrometry. To this end, several systems were tested. The highest recovery of the target protein was achieved with a system using a streptavidin affinity sequence, which has been used for all large scale experiments.

Numerous MR binding proteins were identified, which form a complex together with cytosolic MR. The complex components can be classified into the following groups:

1. Heat shock proteins / chaperones
2. Proteins of the intracellular transport machine
3. Metabolic enzymes
4. Elongation factors
5. Other

The relatively high number of isolated proteins indicates a formation of several MR multiprotein complexes, as shown for the glucocorticoid receptor. Among the identified proteins, both well documented interactors of MR (heat shock proteins HSP70 and HSP90, actin, tubulin) and interaction partners not yet described for MR but for other steroid receptors (ρ 23, 14-3-3 ϵ , GRP78, elongation factors eEF1 and eEF2) were found. In addition, new putative MR binding proteins were identified.

In order to understand the differential effects of various MR-ligands, the ligand dependent recruitment of cofactors was studied. As expected, in the presence of the agonist aldosterone HSPs were bound to MR in a smaller quantity compared to non-stimulated conditions at different time points. Furthermore, two proteins were identified that bound to the MR-complex depending on the ligand used. GRP78 and β -propionyl-CoA-carboxylase precursor were isolated in a complex with non-stimulated and aldosterone-stimulated MR, but no longer after incubation with spironolactone. These findings could indicate a hitherto unrecognized complexity of action of MR antagonists.

PUBLIKATIONEN

Abstracts

Lösel R, Kellner M, Weber M, Baer P, Wehling M. Aldosterone rapidly upregulates expression of genes related to G-protein signalling in human distal tubule cells. The Endocrine Society's 86th Annual Meeting, New Orleans, 2004.

Weber M, Schultz A, Wehling M, Lösel R. A screening approach to identify proteins interacting with mineralocorticoid receptor and ligand dependent changes thereof. 32nd International Aldosterone Conference, Boston, 2006.

Weber M, Schultz A, Wehling M, Lösel R. A screening approach to identify proteins interacting with mineralocorticoid receptor and ligand dependent changes thereof. 48. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 2007.

In Vorbereitung:

Weber M, Schultz A, Wehling M, Lösel R. Identification of Mineralocorticoid Receptor Interacting Proteins: a Proteomics Approach.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Morphologie der Niere	1
1.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	3
1.3	Aldosteron und Mineralocorticoid-Rezeptor	5
1.3.1	Funktion und Wirkung von Aldosteron	5
1.3.2	Der Mineralocorticoid-Rezeptor	8
1.3.2.1	Vorkommen, Aufbau und Struktur	8
1.3.2.2	Funktionsweise des Mineralocorticoid-Rezeptors	9
1.3.2.3	Abbau des Mineralocorticoid-Rezeptors.....	11
1.3.2.4	Klinische Bedeutung von MR-Antagonisten	13
1.4	Der epitheliale Natriumkanal (ENaC)	14
1.4.1	Aufbau und Struktur des ENaC	14
1.4.2	Physiologische Bedeutung und Regulation des ENaC.....	14
2	Projektbeschreibung	16
2.1	Stand der Forschung/Vorarbeiten	16
2.2	Fragestellungen	21
2.2.1	Nähere Charakterisierung ausgewählter Aldosteron-induzierter Gene.....	21
2.2.2	Nähere Charakterisierung des Mineralocorticoid-Rezeptors und Identifizierung interagierender Proteine	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Antikörper.....	22
3.1.1.1	Primärantikörper	22
3.1.1.2	Sekundärantikörper.....	22
3.1.2	Enzyme	22
3.1.3	Kits und Marker.....	22
3.1.4	Radioaktiv markierte Substanzen	23
3.1.5	Geräte	23
3.1.6	Medien, Lösungen, Puffer.....	24
3.1.7	Verbrauchsmaterial.....	25
3.1.8	Chemikalien, sonstige Reagenzien	26
3.1.9	Zellkultur	26
3.1.10	Eukaryotische Zellen.....	26
3.1.10.1	Primärkulturen.....	26

3.1.10.2	Zelllinien.....	27
3.1.11	Bakterienstämme.....	27
3.1.12	Plasmide.....	27
3.1.13	Oligonukleotide.....	27
3.2	Methoden.....	29
3.2.1	Zellkultur.....	29
3.2.1.1	Kultivierung von Primärzellen.....	29
3.2.1.2	Kultivierung von Zelllinien.....	29
3.2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	30
3.2.1.4	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	31
3.2.1.4.1	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGene 6.....	31
3.2.1.4.2	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Calcium-Phosphat.....	31
3.2.1.4.3	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen.....	32
3.2.2	Nukleinsäure-Techniken.....	32
3.2.2.1	RNA-Isolierung.....	32
3.2.2.2	Reverse Transkription.....	32
3.2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
3.2.2.3.1	Konventionelle PCR.....	33
3.2.2.3.2	Real-time PCR.....	34
3.2.2.4	PCR-vermittelte in-vitro Mutagenese.....	35
3.2.2.5	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	37
3.2.2.6	Entfernung von Nukleotiden und Enzymen.....	37
3.2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
3.2.2.8	Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	38
3.2.2.9	Spezifische Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen.....	39
3.2.2.10	Dephosphorylierung von 5'-Enden.....	39
3.2.2.11	Phosphorylierung mit T4 Polynukleotid Kinase.....	39
3.2.2.12	Ligation.....	39
3.2.2.12.1	Ligation mit dem Zero Blunt® TOPO®-Cloning-Kit (Invitrogen).....	40
3.2.2.12.2	Ligation mit dem TA-Cloning-Kit (Invitrogen).....	40
3.2.2.13	Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA.....	41
3.2.2.14	Dauerkulturen von E. coli Bakterien.....	41
3.2.2.15	Plasmidgewinnung aus E. coli (Mini-/ Midi-/Mega-/Gigapräparation).....	41
3.2.2.16	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	43
3.2.2.17	Sequenzierung.....	43
3.2.3	Protein-Techniken.....	44
3.2.3.1	Proteinbestimmung.....	44
3.2.3.2	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
3.2.3.3	Western-Blot.....	45
3.2.3.3.1	Nachweis von Proteinen in der Western-Blot-Analyse.....	45
3.2.3.3.2	Stripping von Western-Blot-Membranen.....	46

3.2.3.4	Anfärben von Proteinen	46
3.2.3.4.1	Coomassie-Färbung	46
3.2.3.4.2	Silberfärbung.....	47
3.2.3.5	Konzentrierung von Proteinen	47
3.2.3.6	Immunpräzipitation.....	48
3.2.3.6.1	Immunpräzipitation Flag-MR und EGFP-MR.....	48
3.2.3.6.2	Immunpräzipitation Strep-Tag MR - One-Strep-Kit® (IBABioTAGnology)	48
3.2.4	Spezielle Methoden	52
3.2.4.1	Ussing-Kammer-Methode.....	52
3.2.4.1.1	Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)	52
3.2.4.1.2	Versuchsanordnung.....	52
3.2.4.1.3	Elektrolytlösungen.....	53
3.2.4.1.4	Elektrische Messungen.....	53
3.2.4.2	Untersuchung G-Protein gekoppelter Signalwege	54
3.2.4.3	[3H]-Thymidin/Leucin-Assay.....	56
3.2.4.4	Transaktivierungsversuche – MMTV-Luc-Reportergen-Assay.....	56
3.2.4.5	Proteasomen-Funktions-Messung.....	58
3.2.4.5.1	Analyse der Protein-Menge nach Zugabe von Proteasom-Inhibitor.....	58
3.2.4.5.2	Promotoraktivität	58
3.2.4.6	Proteinidentifizierung durch „peptide mass fingerprint“ (MALDI)	58
3.2.4.6.1	In-Gel Trypsinverdau	59
3.2.4.6.2	ZipTip®-C18-Peptidaufreinigung	60
3.2.4.6.3	Auswertung der Massenspektren	60

4 Ergebnisse und Diskussion 61

4.1	Molekularer Mechanismus der Wirkung von Aldosteron im distalen Tubulus und Sammelrohr sowie Crosstalk mit RGS3, GDI2, ARL7 und GRK5.....	61
4.1.1	Real-time PCR	61
4.1.1.1	Etablierung der Real-time PCR	61
4.1.1.2	Ergebnisse	62
4.1.2	Subklonierung von RGS3, GDI2, ARL7, und GRK5 in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo	64
4.1.3	Stabile Transfektion der klonierten Expressionskonstrukte in M1-Zellen.....	65
4.1.4	Eigenschaften und Expression	65
4.1.5	Einfluss von RGS3, GDI2, ARL7 und GRK5 auf Zellproliferation und Proteinsyntheserate	66
4.1.6	Wirkung von Aldosteron auf G-Protein gekoppelte Signalwege.....	67
4.1.7	Elektrophysiologische Messungen in der Ussing-Kammer	70
4.1.7.1	Etablierung der Ussing-Kammer-Methode	70
4.1.7.2	Ergebnisse mit distal tubulären Epithelzellen	74
4.1.8	Zusammenfassung	75

4.2	Nähere Charakterisierung des Mineralocorticoid-Rezeptors und Identifizierung interagierender Proteine	79
4.2.1	Biotin-Tag-rMR.....	81
4.2.1.1	Klonierung.....	82
4.2.1.2	Überprüfung der Expression.....	84
4.2.1.3	Funktionalität: Luciferase/Galaktosidase	85
4.2.2	EGFP-hMR	86
4.2.2.1	Überexpression von pEGFP-MR und Immunpräzipitation.....	86
4.2.2.2	Funktionalität: Luciferase/Galaktosidase	87
4.2.3	Flag-Tag-MR.....	89
4.2.3.1	Klonierung pcDNA3.1/Zeo-FlagTag-rMR.....	89
4.2.3.2	Expression	89
4.2.3.3	Funktionalität: Luciferase/Galaktosidase	90
4.2.3.4	Isolierung von Flag-Tag-MR	90
4.2.4	STrEP®-Tag MR.....	91
4.2.4.1	Klonierung.....	91
4.2.4.2	Expression	94
4.2.4.3	Funktionalität: Luciferase/Galaktosidase	95
4.2.4.4	Isolierung des MR und Identifizierung von interagierenden Proteinen.....	97
4.2.5	Proteasomaler Abbau des MR.....	123
4.2.6	Diskussion und Ausblick	126
5	Anhang	136
5.1	Abbildungsverzeichnis.....	136
5.2	Tabellenverzeichnis.....	139
5.3	Literaturverzeichnis.....	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-diphosphat
ATP	Adenosin-triphosphat
AgCl	Silberchlorid
AR	Androgen-Rezeptor
ARL7	ADP-ribosylation-like factor 7
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Calciumion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CIAP	engl.: Calf intestine alkaline phosphatase
Cl ⁻	Chloridion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	crossing point
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
dATP	desoxy-Adenosin-triphosphat
dCTP	desoxy-Cytidin-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	desoxy-Guanosin-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	eng.: Dulbecco`s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Mischung von desoxy-triphosphat-Nukleotiden
DTT	Dithiothreitol
dTTP	desoxy-Thymidin-triphosphat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ER	Estrogen-Rezeptor
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
GDI2	GDP dissociation inhibitor
GFP	Grün-fluoreszierendes-Protein
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GRK5	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 5
h	Stunde
³ H	Tritium

H ⁺	Proton
HCl	Salzsäure
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
H ₂ O	Wasser
HRE	Hormon-responsives Element
HSP	Hitzeschockprotein
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IP	Immunpräzipitation
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/l)
MMTV	mouse mammary tumor virus
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
MW	Molekulargewicht
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar (μmol/l)
n	Anzahl der Werte
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP-40	Nonidet P-40, nichtionisches Detergens
O ₂	Sauerstoff
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RALES	Randomized Aldactone Evaluation Study
RGS3	Regulator of G-Protein-Signalling
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s, sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tm	Schmelztemperatur
TR	Thyroid-Hormon-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X100	p-Isooctylphenylpolyoxyethylen
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
UV	ultraviolettes Licht

1 Einleitung

1.1 Morphologie der Niere

Die Nieren dienen neben der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Fremdstoffen und der Synthese von Hormonen wie Renin und Erythropoietin vor allem der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie des Säure- und Basenhaushalts.

Die funktionelle und strukturelle Einheit der Niere ist das Nephron. Jede menschliche Niere besteht aus ca. 1 bis 1,2 Millionen Nephronen. Ein Nephron setzt sich aus dem Nierenkörperchen, den Nierenkanälchen (tubuli renales) und dem Sammelrohr zusammen. Ein Nierenkörperchen wird aus dem Kapillarknäuel (Glomerulus), welches durch die Verzweigung der zuführenden Arteriole (Vas afferens) entsteht, und einer umgebenden zweiblättrigen Epithelkapsel (Bowmansche Kapsel) gebildet. Der Glomerulus stellt die Filtrationseinheit der Niere dar. Das hier gebildete Ultrafiltrat besteht aus Wasser sowie im Plasma gelösten, filtrierbaren Substanzen und wird als Primärharn bezeichnet. Proteine über ~70kDa können das Filter der Glomerulusschlingen nicht passieren. Der Primärharn wird im sog. Harnpol ins Tubulussystem gepresst. Die Filtrationsrate in den Nieren beträgt bei einem Erwachsenen ca. 180 Liter pro Tag. Ungefähr 99% dieses Filtrats werden während der Passage durch das Tubulussystem wieder rückresorbiert, was ein Zeichen für die ausgeprägte Resorptionsleistung der Niere darstellt.

Der Tubulus wird in mehrere Abschnitte eingeteilt: den proximalen Tubulus, die Henle'sche Schleife mit einem dünnen absteigenden und einem im oberen Teil dicken aufsteigenden Schenkel und den distalen Tubulus, der in das Sammelrohr mündet.

Wasser und Elektrolyte werden in den einzelnen Tubulusabschnitten unterschiedlich rückresorbiert (siehe Abbildung 1), so dass sich Menge und Zusammensetzung des Harns während der gesamten Passage stetig ändern. Am Ende der Nierentubuli erreicht der sogenannte Sekundärharn das Nierenbecken und wird schließlich als Endharn über die Blase ausgeschieden.

Der proximale Tubulus, welcher in der Nierenrinde verläuft, stellt aufgrund seiner Struktur den wichtigsten Teil des resorbierenden Systems dar. Die meisten Ionen sowie Harnstoff, Wasser und die gesamte Glukose werden hier zurück resorbiert. Die treibende Kraft für die Rückresorption von Na^+ und Cl^- , aber auch von anderen Ionen wie K^+ , HCO_3^- und Phosphat ist die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase. Insgesamt werden in diesem Abschnitt ca. 60% des filtrierten Wassers und 50% des Natriums und Chlorids rückresorbiert.

Die Henle'sche Schleife besteht aus 3 Abschnitten: einem geraden absteigenden Teil, einem dünnen Intermediärtubulus und einem dicken aufsteigenden Teil. Durch diesen Aufbau entsteht in der Henle'schen Schleife ein Haarnadelgegenstrom, wodurch ein

osmotischer Gradient erzeugt wird. In diesem Abschnitt werden weitere 10% des filtrierte Wassers und 20-30% des filtrierte Natriums zurück gewonnen, und zwar vorwiegend im dicken aufsteigenden Schleifenschenkel. Der aktive Ionentransport erfolgt auch hier durch die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase. Auf der luminalen Seite befindet sich jedoch ein Kotransportsystem, über das 1 Natriumion, 1 Kaliumion und 2 Chloridionen ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter) in die Zelle eingeschleust werden. Im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife findet außerdem der größte Teil der Magnesiumresorption statt. Etwa zwei Drittel des filtrierte Magnesiums werden hier hauptsächlich parazellulär rückresorbiert.

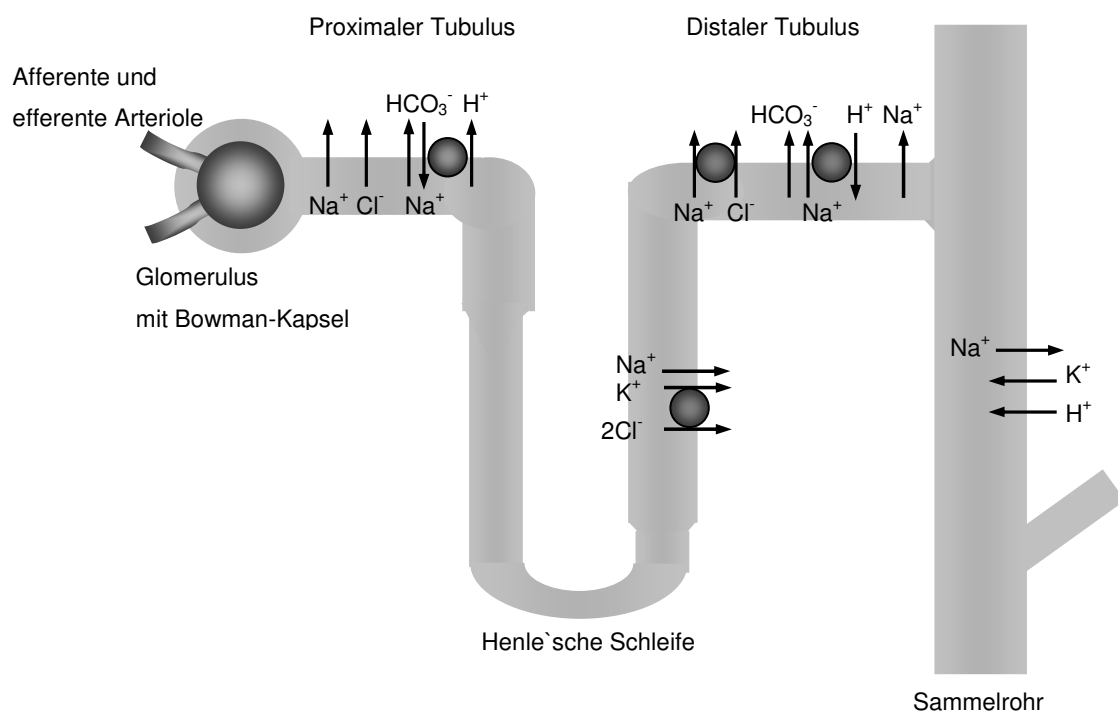


Abbildung 1 Natriumresorptionsmechanismen in den einzelnen Tubulusabschnitten

An die Henle'sche Schleife schließt sich der distale Tubulus an. Der Anfangsteil des distalen Tubulus ist dem dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife ähnlich. Er ist verantwortlich für die Resorption von Natriumionen. Etwa 8% des filtrierte Natriumchlorids werden im frühdistalen Tubulus rückresorbiert sowie 10-20% des Wassers. Verantwortlich für die Resorption von Natrium- und Chloridionen ist ein Na^+/Cl^- -Kotransportsystem in der luminalen Membran. Im spätdistalen Tubulus und im Sammelrohr erfolgt die Feineinstellung der Elektrolytresorption. Unter der hormonellen Kontrolle von Aldosteron wird weiter Natrium über apikale Natriumkanäle resorbiert. Dabei sind Öffnungshäufigkeit und -dauer der Natriumkanäle neben der vorliegenden Aldosteronkonzentration auch von der Konzentration Aldosteron-induzierter Proteine (AIP)

abhängig. Die Resorption von Wasser wird im distalen Konvolut und im Sammelrohr durch Vasopressin kontrolliert. Dieses bewirkt über V_2 -Rezeptoren eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und steigert die Wasserpermeabilität durch einen Einbau von Aquaporinen in die luminale Membran^{1,2}. Der Wassertransport ist in diesen Abschnitten von der Flüssigkeitsbilanz abhängig. Bei einem Wassermangel wird durch die Zunahme der osmotischen Konzentration im Blut vermehrt Vasopressin ausgeschüttet und damit mehr Wasser rückresorbiert. Umgekehrt wird bei einem Wasserüberschuss die Vasopressin-Freisetzung gehemmt und hierdurch weniger Wasser retiniert. Der Harn wird vom Sammelrohr aus zur Papillenspitze geleitet. Jedes Sammelrohr besitzt mehrere Zuflüsse aus benachbarten Nephronen.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (s. Abbildung 2) bilden die größte Gruppe von Rezeptoren im Organismus. Sie sind heptahelikale, transmembranäre Proteine, die an zahlreichen Signalübertragungswegen beteiligt sind. Die Bindung eines Liganden an der extrazellulären Seite ruft eine Konformationsänderung des Rezeptors in seine aktive Form hervor³. Hierdurch wird auf der intrazellulären Seite ein heterotrimeres G-Protein aktiviert. Im nicht-aktivierten Zustand bindet GDP an die α -Untereinheit des G-Protein-Komplexes. Durch die Interaktion von Rezeptor und Ligand wird GDP gegen GTP ausgetauscht und der trimere Komplex dissoziiert in die α -Untereinheit, an die weiter GTP gebunden bleibt, und die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Sowohl die aktivierte α -Untereinheit als auch das $G\beta\gamma$ -Dimer können nun mit Effektorproteinen interagieren, welche dadurch ihrerseits aktiviert werden und u.a. die Bildung von „second messenger“-Molekülen bewirken.

Beendet wird diese Reaktion aufgrund der intrinsischen GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit, wodurch das angelagerte GTP in GDP und anorganisches Phosphat gespalten und eine Reassoziierung des Heterotrimers hervorgerufen wird. In diesen Kreislauf greift eine Anzahl von Proteinen regulierend ein. So z.B. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), die die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit verstärken. Zu dieser Gruppe gehören sog. RGS-Proteine, *regulators of g-protein signalling*⁴, die die Reassoziierung von $G\alpha$ -GDP und $G\beta\gamma$ und somit den Übergang des G-Protein-Aktivierungs-Zyklus in den Grundzustand beschleunigen⁵.

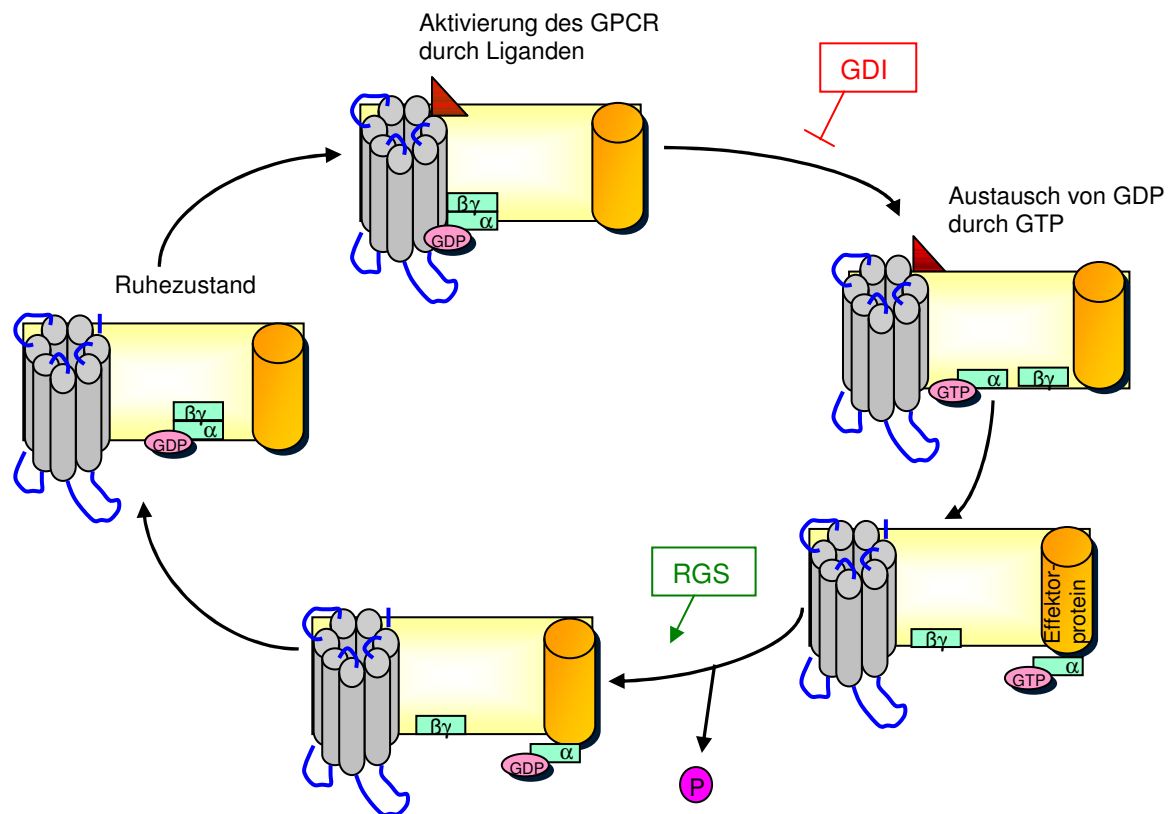


Abbildung 2 Mechanismus von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

GRKs (**G**-protein coupled **r**eceptor **k**inase) regulieren die Aktivität des Ligand-besetzten, aktivierten Rezeptors. Sie phosphorylieren den C-Terminus an intrazellulären Schleifen des Rezeptors und fördern so die Bindung von β -Arrestinen an GRK-phosphorylierte GPCRs. Hierdurch wird die Interaktion zwischen dem GPCR und dem G-Protein entkoppelt und der Rezeptor desensibilisiert⁶.

Daneben nehmen auch **GDI**-Proteine (**GDP dissociation Inhibitors**) Einfluss auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, indem sie den Austausch von GDP und GTP verhindern.

Das bislang am besten untersuchte G-Protein-regulierte Effektorsystem ist das Adenylylcyclase-System. Zahlreiche Hormone wie Adrenalin (β -Rezeptor) und Vasopressin (V_2 -Rezeptor) führen über eine Rezeptor vermittelte Aktivierung der Adenylylcyclase zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle. cAMP löst Folgereaktionen aus, z.B. die Aktivierung der Proteinkinase A und somit die Phosphorylierung von Proteinen. Dies können Enzyme oder auch Ionenkanäle sein, die durch die Phosphorylierung aktiviert oder inaktiviert werden. Hierdurch werden physiologische Reaktionen ausgelöst, die für die Regulation zellulärer Funktionen von zentraler Bedeutung sind.

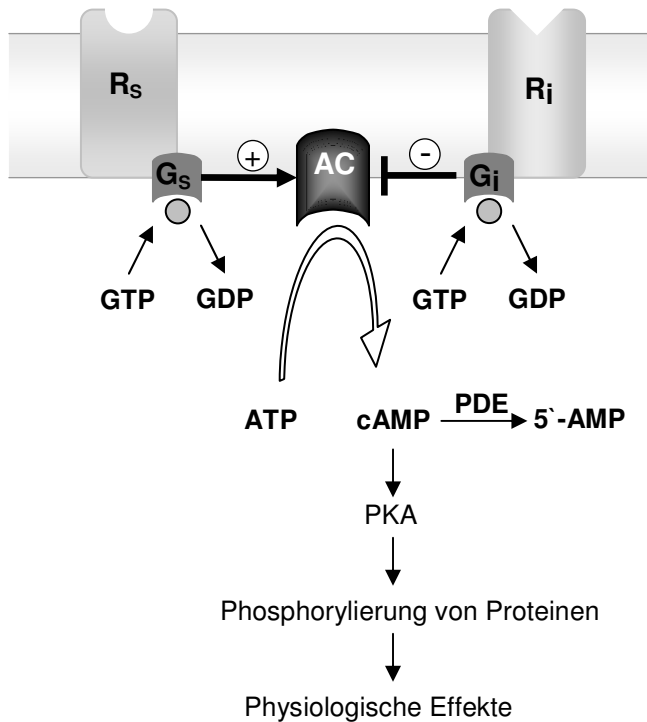


Abbildung 3 Intrazelluläre Signaltransduktion durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

AC Adenylylcyclase, ATP Adenosin-
triphosphat, G_s stimulierendes G-Protein,
 G_i hemmendes G-Protein, GTP
Guanosintriphosphat, GDP
Guanosindiphosphat, PKA Proteinkinase
A, R_s stimulierender Membranrezeptor, R_i
hemmender Membranrezeptor, PDE
Phosphodiesterase

1.3 Aldosteron und Mineralocorticoid-Rezeptor

1.3.1 Funktion und Wirkung von Aldosteron

Aldosteron ist das physiologisch wichtigste Mineralocorticoid. Es wird wie das Glucocorticoid Cortisol in der Nebennierenrinde produziert. Während Mineralocorticoide in der äußeren Schicht der Nebennierenrinde, der so genannten Zona glomerulosa, gebildet werden, findet die Synthese von Glucocorticoiden wie Cortisol und Cortison in der mittleren Schicht, der Zona fasciculata statt.

Aldosteron spielt in der Niere eine wichtige Rolle, indem es über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (siehe Abbildung 4) und durch die Aktivierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC) entscheidend an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts und damit an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist.

Die Ausschüttung von Aldosteron unterliegt also dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS): Die Protease Renin spaltet spezifisch Angiotensinogen zum physiologisch inaktiven Dekapeptid Angiotensin I. Ein Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) spaltet wiederum von Angiotensin I zwei Aminosäuren zum aktiven Oktapeptid Angiotensin II ab. Angiotensin II stimuliert seinerseits die Freisetzung von Aldosteron.

Die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes unterliegt neben dem RAAS auch der neurohumoralen Regulation durch das atriale natriuretische Peptid (ANP) sowie durch Vasopressin.

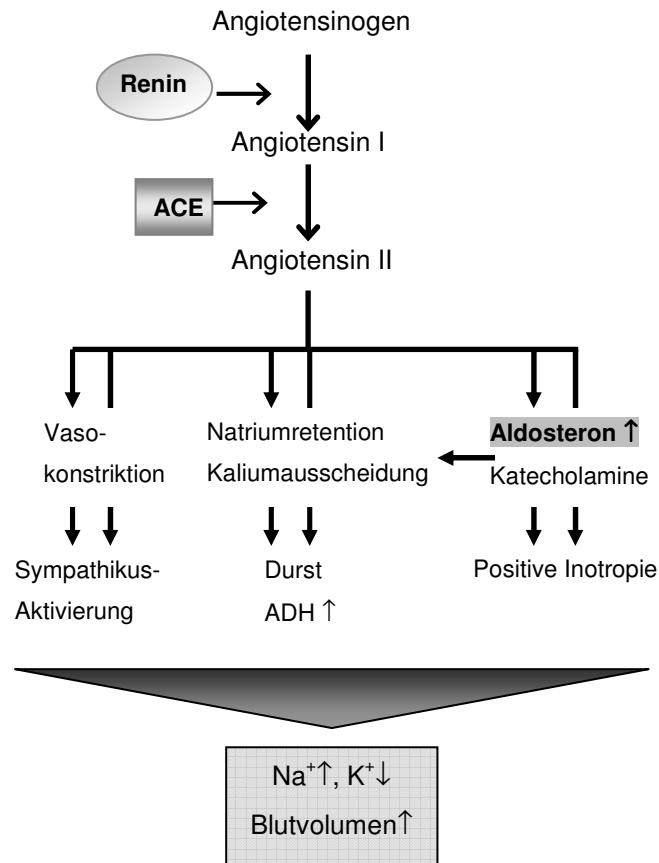


Abbildung 4 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Aldosteron initiiert sowohl genomische als auch nicht-genomische Wirkungen. Eine genomische Wirkung erfordert die Bindung von Aldosteron an einen intrazellulären Rezeptor, den Mineralocorticoid-Rezeptor. Der Aldosteron-Rezeptor-Komplex transloziert daraufhin in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor, was die Synthese spezifischer Proteine zur Folge hat. Im distalen Abschnitt der Nierentubuli und im Sammelrohr wird die Bildung des epithelialen Natriumkanals (ENaC) sowie dessen Vorkommen an der Zellmembran verstärkt (siehe Abbildung 5). Dadurch steigt einerseits die Rückresorption von Natriumionen, andererseits wird die Ausscheidung von Kalium- und Wasserstoffionen erhöht. Gleichzeitig wird Wasser zurückgehalten (vgl. Kap. 1.2).

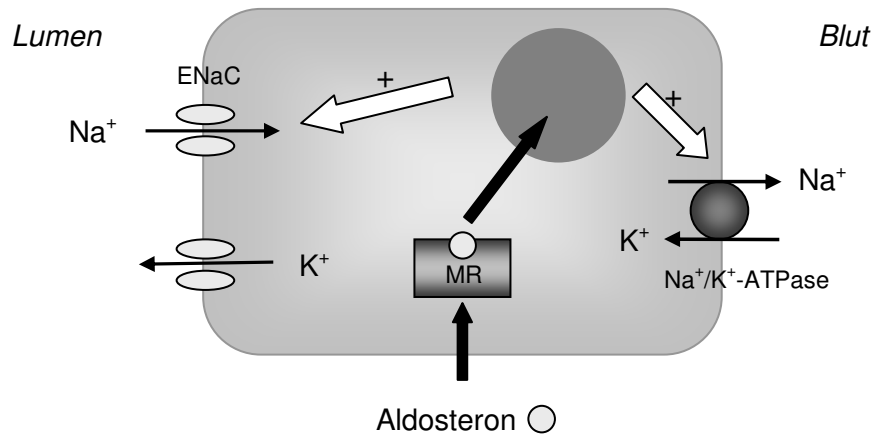


Abbildung 5 Mechanismus des Ionentransports im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron

Bisher sind die Mechanismen, über die Aldosteron ENaCs reguliert, noch nicht vollständig bekannt. Es gilt als wahrscheinlich, dass verschiedene Aldosteron-induzierte Gene wiederum andere Signalkaskaden aktivieren, die ihrerseits in die Aktivierung des epithelialen Natriumkanals eingebunden sind. So wurde gezeigt, dass Aldosteron den Natriumtransport via ENaCs auf zwei Wegen regulieren kann: entweder durch eine Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit (P_0) vorhandener Kanäle⁷ oder durch eine Erhöhung der Anzahl von Kanälen in der apikalen Membran (N)⁸⁻¹⁰. Die Effekte von Aldosteron auf den Natriumtransport laufen in zwei Stufen ab: einer frühen Phase (1-6h) und einer späten Phase (>6h)¹¹. Die frühe Phase resultiert aus einer Induktion von Signalproteinen durch Aldosteron, was zur Aktivierung existierender ENaC-Kanäle und anderer in den Natrium-Transport involvierter Proteine führt. Die späte Phase der Aldosteronantwort (mehrere Stunden bis Tage) beruht auf verstärkter Transkription und Translation der ENaC-Untereinheiten¹² und der Na^+/K^+ -ATPase¹³.

Neben diesen genomischen Effekten sind ebenfalls schnelle, nicht-genomische Aldosteronwirkungen berichtet worden, die über den klassischen MR vermittelt werden und durch Spironolacton, Eplerenon oder Canrenoat gehemmt werden konnten¹⁴⁻¹⁷. Schnelle, nichtgenomische Effekte treten wenige Minuten nach Aldosteron-Applikation auf und verschwinden nach 5 bis 10 Minuten. Diese Zeitspanne ist zu kurz, um diese Wirkungen über klassische, genomische Effekte, also als Ergebnis einer Gentranskription, erklären zu können.

Zudem sind auch schnelle, nichtgenomische Effekte von Aldosteron beobachtet worden, die weder durch Cortisol nachgeahmt, noch durch Spironolacton gehemmt werden konnten¹⁸. Man vermutet, dass diese Effekte nicht über den MR, sondern über einen membranständigen Rezeptor vermittelt werden.

1.3.2 Der Mineralocorticoid-Rezeptor

1.3.2.1 Vorkommen, Aufbau und Struktur

Der Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) ist ein intrazellulär vorkommender Hormonrezeptor und gehört zur Superfamilie der „nukleären“ oder Kern-Rezeptoren. Er weist eine für Steroidrezeptoren charakteristische Domänenstruktur auf, bestehend aus N-terminaler Domäne (NTD), DNA-bindender Domäne (DBD) und Liganden-bindender Domäne (LBD).

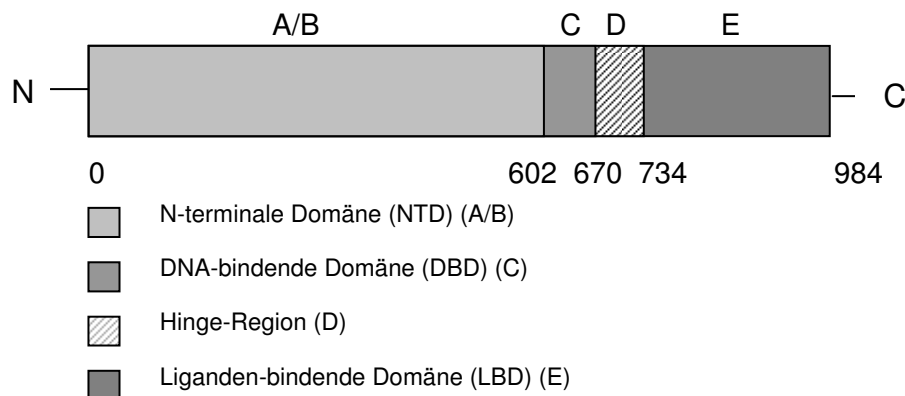


Abbildung 6 Aufbau des Mineralocorticoid Rezeptors¹⁹

Nukleäre Rezeptoren besitzen zwei funktionelle Domänen in ihrer N-terminalen A/B und ihrer C-terminalen E-Domäne. Während die autonome Aktivierungsfunktion 2 (AF-2) in der C-terminalen E-Domäne von der Bindung eines Liganden abhängig ist, ist die autonome Aktivierungsfunktion 1 (AF-1) in der N-terminalen A/B Domäne konstitutionell aktiv²².

Innerhalb der Superfamilie nukleärer Rezeptoren ist die zentrale DNA-bindende Domäne (DBD) mit einer Übereinstimmung von 94% in der Aminosäuresequenz hochkonserviert. Sie enthält zwei Zinkfingerstrukturen, die in die DNA-Bindung und Rezeptor-Dimerisierung involviert sind. Die C-terminal gelegene LBD vermittelt zahlreiche Funktionen wie Ligandenbindung, Interaktion mit Hitzeschockproteinen und transkriptionellen Koaktivatoren, Dimerisierung sowie Hormon-abhängige Aktivierung. Die LBD weist in der Gruppe der Steroidrezeptoren ebenfalls große Homologien auf. Die Aminosäuresequenzen von GR und MR z.B. stimmen in der LBD zu 57% überein. Die N-terminale Region des MR hingegen teilt weniger als 15% Sequenz-Homologie mit der NTD des GR und besitzt zwei unterschiedliche Aktivierungsdomänen AF1a und AF1b²⁰, im Gegensatz zum GR, der nur eine Aktivierungsfunktion in der NTD aufweist²¹. Die NTD scheint hiermit für die Rezeptorspezifität und Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität zwischen MR und GR verantwortlich zu sein^{20,22,314,23}.

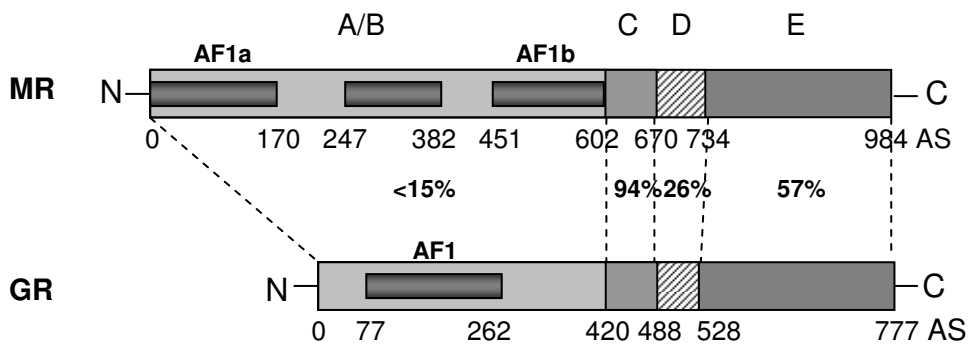
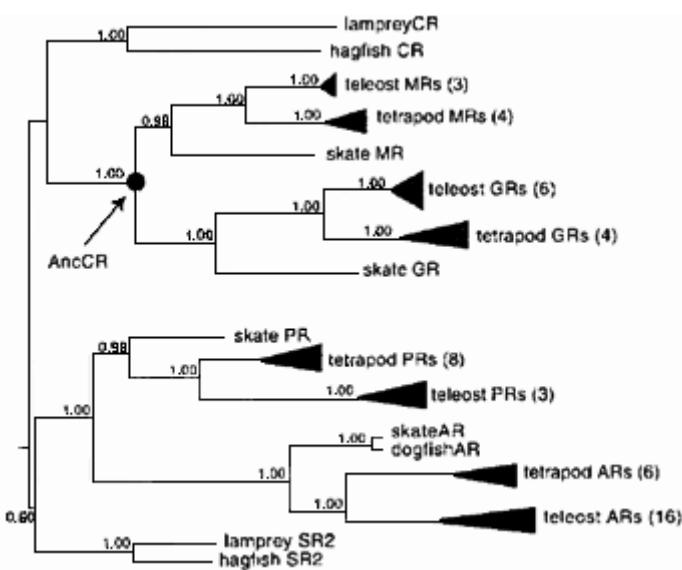


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Strukturen von MR und GR mit prozentualer Anteil der Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz in den einzelnen Domänen¹⁹

Klassische Zielorgane für Aldosteron sind die Zellen des Sammelrohrs, des dicken Teils der aufsteigenden Henle'schen Schleife der Niere sowie Zellen des Colons. Darüber hinaus konnte der MR bereits in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden, z.B. in Auge, Blut, Haut, Herz, Leber und Lunge.

1.3.2.2 Funktionsweise des Mineralocorticoid-Rezeptors

Im nicht-aktivierten Zustand liegt der MR im Zytosol an Hitzeschockproteine (HSP) gebunden vor. Nach der Aktivierung des MR durch die Bindung von Aldosteron an der LBD kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die Hitzeschockproteine dissoziieren und der MR wandert in den Zellkern. Dort bindet der MR in dimerisierter Form an spezifische DNA-Sequenzen, so genannte Hormon-responsive Elemente (HRE) und wirkt so als Transkriptionsfaktor. Unter den nukleären Rezeptoren weist der MR die größte Homologie in seiner Aminosäuresequenz zum Glucocorticoidrezeptor auf.



Phylogenetisch entstanden GR und MR vor über 450 Millionen Jahren durch Gen-Duplikation aus einem gemeinsamen Ur-Corticosteroid-Rezeptor (AncCR). Bridgham et al.²⁴ zeigten, dass sich die MR-Aldosteron Partnerschaft in Einklang mit der Darwin-Theorie schrittweise entwickelt hat. Sie stellten fest, dass die Sensitivität des MR der Entstehung des Hormons Aldosteron vorausging.

Abbildung 8 Phylognese der Steroidhormon-Rezeptoren²⁴

Der AncCR wies also bereits eine Affinität für beide Klassen von Hormonen auf, bevor Aldosteron überhaupt existierte. Aus einer Gen-Duplikation sind schließlich GR und MR aus dem AncCR hervorgegangen. Zwei Veränderungen in der GR-Sequenz verhinderten eine Aktivierung durch Aldosteron, hielten aber die Sensitivität für Cortisol aufrecht. Der heute existierende MR hat den Ur-Phänotyp beibehalten. Die Spezifität der MR-Aldosteron Beziehung ist also Folge eines sekundären Verlustes der Aldosteron-Sensitivität am GR.

Der heutige Mineralocorticoid-Rezeptor ist jedoch nicht Liganden-selektiv. Er ist noch in der Lage, sowohl Aldosteron als auch Glucocorticoide zu binden, wobei die Affinität von Cortisol zum MR ungefähr um den Faktor 10 höher ist als die von Aldosteron und Glucocorticoide in einer 100 bis 1000-fach höheren Konzentration im Vergleich zu Aldosteron (0,1-1nM) im Plasma vorliegen.

Obwohl der MR die größte Homologie zum GR aufweist, ist die Struktur der MR LBD der des Progesteron-Rezeptors (PR) am ähnlichsten. Die Ligandenbindungstasche des MR ist kompakter und kleiner, während die GR Tasche verzweigt ist und neben der Kern-Bindungstasche eine Seitentasche enthält²⁵. Dies erklärt, warum Cortisol mit einer höheren Affinität (Faktor 10) an den MR als an den GR bindet²⁶.

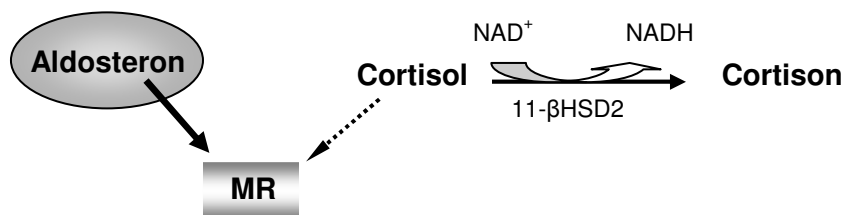


Abbildung 9 Liganden des Mineralocorticoid-Rezeptors

Die Selektivität des MR für Aldosteron hängt maßgeblich von der Aktivität eines Enzyms, der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 β -HSD2) ab, welche unter Bildung von NADH aktives Cortisol in inaktives Cortison umwandelt (siehe Abbildung 9) und so den MR vor einer Überflutung mit Glucocorticoiden bewahrt. Aldosteron wird hingegen nicht vergleichbar metabolisiert, da seine C11 Hydroxylgruppe mit der C18 Aldehydgruppe unter Bildung eines 11,18 Hemiacetals cyclisiert und so vor einem Angriff durch die 11 β -HSD2 geschützt ist (siehe Abbildung 10).

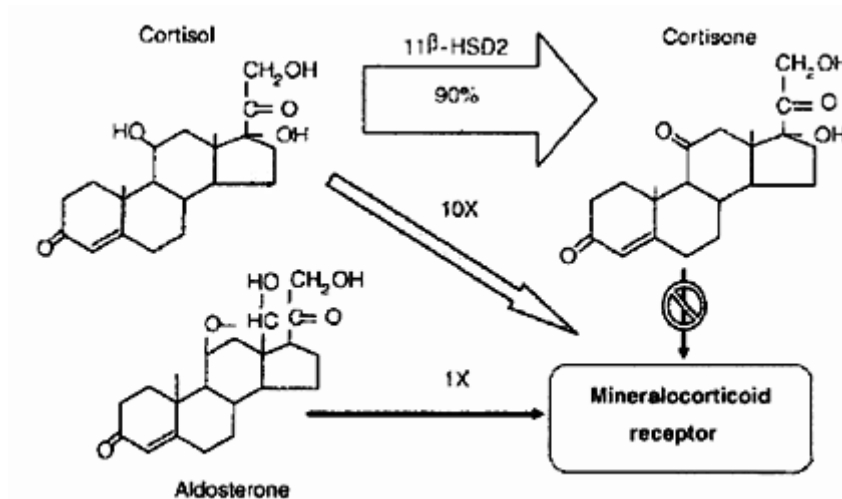


Abbildung 10 Angriff von Aldosteron und Cortisol am Mineralocorticoid-Rezeptor. Schutz des MR durch das Enzym 11-β-HSD2 vor einer Überflutung mit Glucocorticoiden (entnommen aus Mihailidou AS und Funder JW. 2005²⁷).

1.3.2.3 Abbau des Mineralocorticoid-Rezeptors

Proteine werden in der Zelle an zwei unterschiedlichen Orten abgebaut: exogene Proteine, Krankheitserreger usw. werden unspezifisch durch Endocytose in Lysosomen aufgenommen und dort durch lysosomale Proteasen (Cathepside) abgebaut. Endogene Proteine – hierzu zählen auch falsch gefaltete und beschädigte Proteine – werden hingegen in eukaryotischen Zellen durch Proteasomen abgebaut. Das wichtigste Element für diesen ATP-abhängigen Mechanismus bildet das 26S-Proteasom. Dieses besteht aus einem zentralen 20S-Kernpartikel und zwei peripheren 19S-Regulatorkappen^{28,29}. Für den proteolytischen Abbau müssen die Proteine erst kovalent unter ATP-Verbrauch mit Ubiquitin verknüpft werden. Das 76 Aminosäuren kleine Ubiquitin wird mit Hilfe von Ubiquitin-Ligasen an das abzubauende Protein angehängt. Die so markierten Proteine werden dann durch das 26S-Proteasom degradiert.

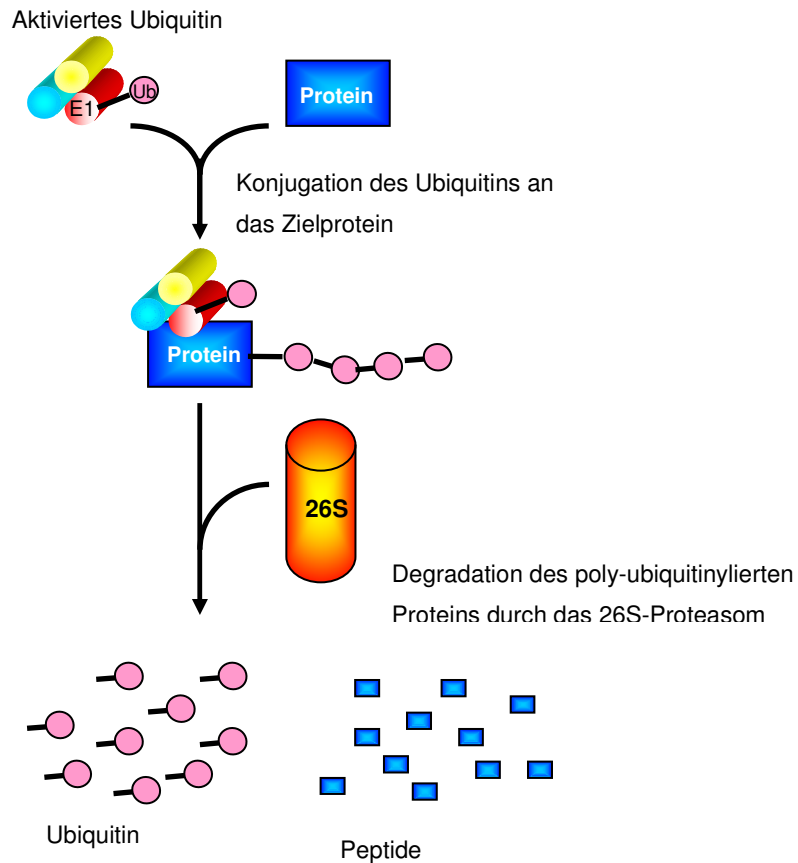


Abbildung 11 Der Ubiquitin-Proteasom-Weg. Verändert nach Ciechanover; BioEssays 22.5 (2000)³⁰ *Ub* Ubiquitin, *E1* Ubiquitin-aktivierendes Enzym

Ein derartiger proteolytischer Abbaumechanismus konnte bereits für den Estrogen^{-31,32} und den Glucocorticoidrezeptor nachgewiesen werden^{33,34}. Für den Mineralocorticoid-Rezeptor wird daher ebenfalls ein entsprechender Mechanismus postuliert³⁵ (siehe Abbildung 12). Yokota et al. lieferten 2004 erste Hinweise darauf, dass auch der MR möglicherweise über den Ubiquitin-Proteasom-Pathway abgebaut wird³⁶.

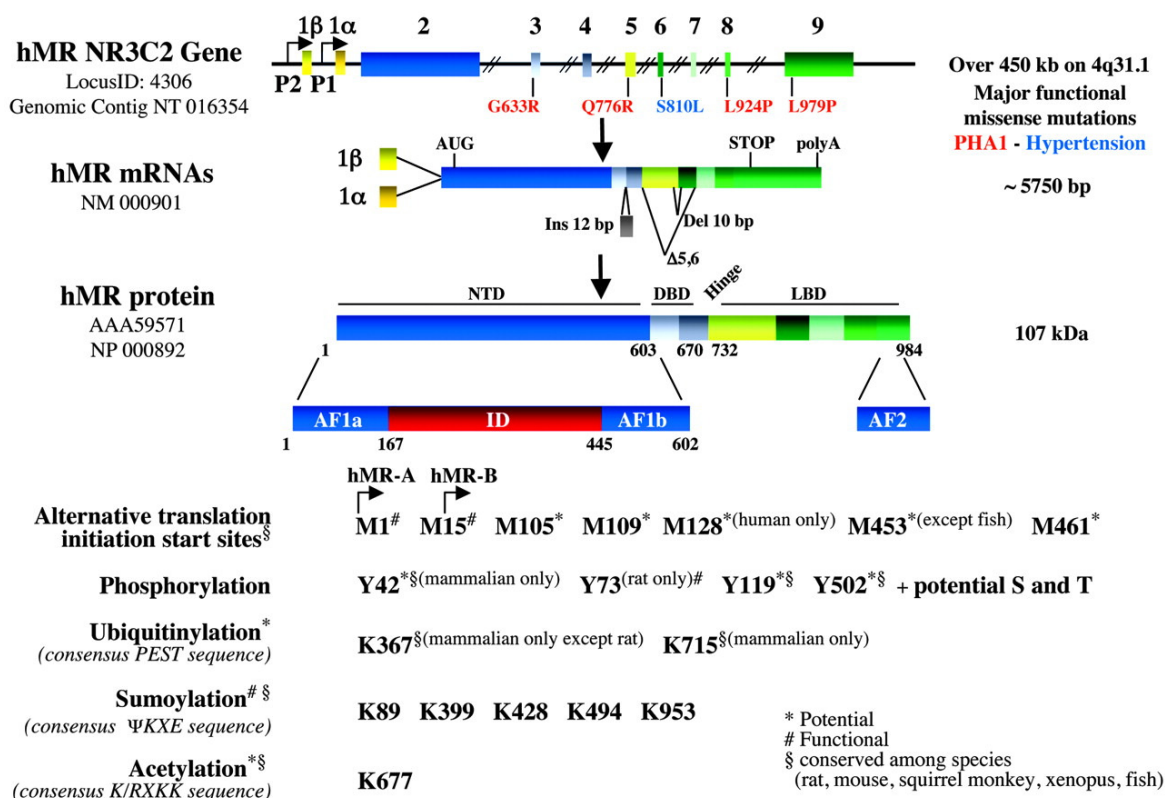


Abbildung 12 Prozessierung und Abbau des MR. Entnommen aus Tallec und Lombes 2005³⁷

1.3.2.4 Klinische Bedeutung von MR-Antagonisten

Der MR-Antagonist Spironolacton wird seit mehr als 30 Jahren erfolgreich als Diuretikum in der Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt. In der Therapie von Herzerkrankungen galt Spironolacton jedoch lange Zeit aufgrund seiner Kalium-sparenden Eigenschaften in Verbindung mit einem ACE-Hemmer als kontraindiziert, da eine Hyperkaliämie vermieden werden sollte. Spironolacton wirkt jedoch nicht selektiv am MR, sondern blockiert einerseits ebenfalls Androgenrezeptoren und aktiviert andererseits Progesteronrezeptoren. Hierdurch können unerwünschte antiandrogene oder progestagene Nebenwirkungen auftreten. Diese können durch Verwendung des neueren, selektiveren Wirkstoffes Eplerenon vermieden werden³⁸. Spätestens seit der 1999 veröffentlichten RALES (Randomized Aldactone Evaluation Study)³⁹ sowie der 2003 veröffentlichten EPHEBUS⁴⁰ Studie haben Aldosteron und Spironolacton bzw. Eplerenon wieder vermehrt Beachtung gefunden. In die RALES Studie wurden Patienten eingeschlossen, die innerhalb der letzten 6 Monate vor Studienbeginn ein Herzversagen erlitten hatten (NYHA Klasse IV). Eine Blockade des Aldosteronrezeptors mit Spironolacton in Kombination mit einer Standardtherapie (Schleifendiuretikum, ACE-Hemmer und z.T. Digoxin) reduzierte in diesen Patienten die Sterblichkeitsrate signifikant um 30%, so dass die Studie aus ethischen Gründen vorzeitig abgebrochen wurde, um

Patienten aus dem Placeboarm eine Therapie mit Spironolacton nicht vorzuenthalten. Die in dieser Studie eingesetzte Spironolacton-Dosierung von 25mg erzeugt alleine keinen diuretischen oder blutdrucksenkenden Effekt, was auf kardioprotektive Eigenschaften von Spironolacton hinweist. Auch in der EPHEBUS-Studie konnte das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko durch Therapie mit dem selektiveren MR-Antagonisten Eplerenon deutlich reduziert werden, auch wenn die Reduktion der Sterblichkeitsrate geringer als in der RALES-Studie ausgeprägt war. Dies ist zumindest teilweise darauf zurückzuführen, dass Eplerenon eine höhere Selektivität für den MR als Spironolacton aufweist.

1.4 Der epitheliale Natriumkanal (ENaC)

Aldosteron vermittelt seine Wirkungen auf den Ionenhaushalt durch die Bindung an den Mineralocorticoid-Rezeptor. Hierdurch erfolgt eine Stimulation der Synthese von epitheliale Natriumkanal ENaC und basolateraler Na^+/K^+ -ATPase.

1.4.1 Aufbau und Struktur des ENaC

Der epitheliale Natriumkanal ist ein spannungsabhängiger Ionenkanal, der sehr spezifisch durch Amilorid blockiert werden kann. Er setzt sich aus den drei homologen Untereinheiten α , β und γ zusammen, die als Heterotetramer vorliegen (2α , 1β 1γ) (s. Abbildung 13). Die Bindungsstelle für Amilorid befindet sich auf den extrazellulären Domänen der ENaC-Untereinheiten.

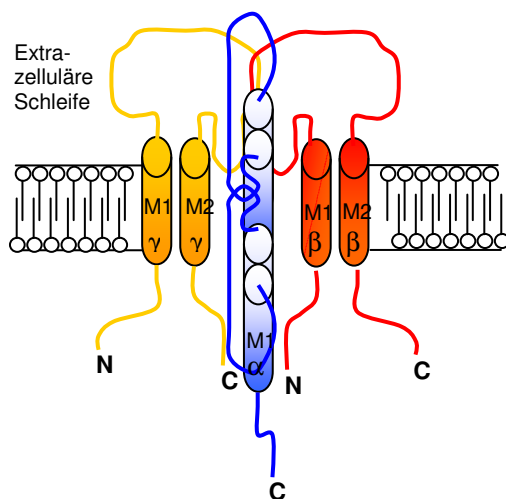


Abbildung 13 Aufbau ENaC Jede Untereinheit des ENaC besteht aus zwei transmembranen Domänen (M1 und M2) mit kurzen zytoplasmatischen carboxy- und aminoterminalen Enden und einem großen extrazellulären Loop.⁴¹

1.4.2 Physiologische Bedeutung und Regulation des ENaC

Der epitheliale Natriumkanal kommt neben der Niere auch im distalen Colon, in Lunge, Schweiß- und Speicheldrüsen sowie anderen Geweben vor. Die wichtigste Rolle spielt er jedoch im distalen Nephron. Durch die Regulation der Na^+ -Resorption und damit auch der Na^+ -Homöostase ist er - zusammen mit Aldosteron und Vasopressin - maßgeblich an der Regulation von Blutvolumen und Blutdruck beteiligt.

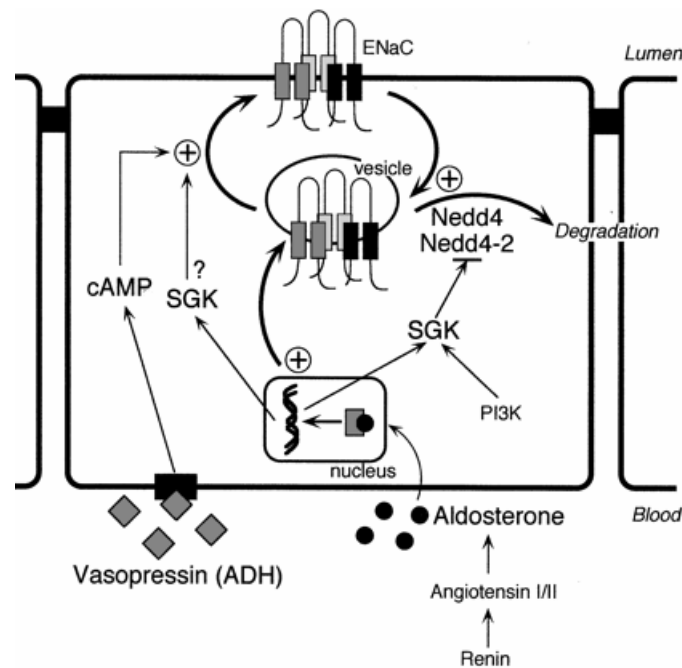


Abbildung 14 Regulation der ENaC Expression (aus Snyder 2002⁴²)

Die Regulation des ENaC unterliegt vor allem der Kontrolle von zwei Proteinen: der Serum- und Glucocorticoid-Kinase 1 (Sgk1) und der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2. Der epitheliale Natriumkanal liegt auch in zytoplasmatischen Vesikeln vor (inaktiv). Sgk1 verstärkt die Expression des ENaC an der Zelloberfläche entweder durch ein verstärktes Trafficking des ENaC an die Zellmembran oder durch eine Hemmung des Abbaus.

Sgk1 moduliert die Funktion von Nedd4-2. Es bewirkt eine Phosphorylierung von Nedd4-2, wodurch die Bindung von Nedd4-2 an den ENaC herabgesetzt und so eine Inhibierung des ENaC durch Nedd4-2 reduziert wird.

Die Interaktion von Sgk1 und Nedd4-2 kann durch weitere Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst werden, z.B. durch Mitglieder aus der 14-3-3-Familie regulatorischer Proteine. Eine Interaktion von Sgk1 und 14-3-3 unterbindet die Nedd4-2 abhängige Ubiquitinierung des ENaC und moduliert so den ENaC vermittelten Natriumstrom⁴³.

Aldosteron fördert zum einen über Sgk1 die eben beschriebene Translokation des ENaC in die Zellmembran, zum anderen erhöht es aber auch die Transkription von ENaC-Untereinheiten.

2 Projektbeschreibung

2.1 Stand der Forschung/Vorarbeiten

In früheren Versuchen im Institut für Klinische Pharmakologie Mannheim wurde die schnelle Aldosteron-induzierte Expression in einer gemischten Population von humanen renalen Epithelzellen untersucht. Dabei wurden in einem Screen von 1400 Genen 14 Gene identifiziert, die innerhalb von 90 Minuten signifikant reguliert waren. Auffälligerweise wurde die Induktion eines Gens (*gadd153*) weder durch Spironolacton noch durch den GR-Hemmstoff RU486 inhibiert, was möglicherweise auf einen nichtklassischen Mechanismus hindeutet⁴⁴. In anderen Versuchen waren in verschiedenen definierten Nierenzellpopulationen schnelle, nicht-genomische Reaktionen auf Aldosteron beobachtet worden⁴⁵, unter anderem in Zellen des distalen Tubulusepithels (DTEC). Diese Zellen wurden ebenfalls mittels eines Expressionsarrays auf ihre Genexpression untersucht. Von 8300 untersuchten Genen wurden 79 Gene innerhalb von 2 Stunden signifikant reguliert. Aufgrund einer ersten Analyse wurden hiervon 20 Transkripte ausgewählt, deren Expression durch kompetitive PCR und/oder Northern Blot bestätigt wurde. Interessanterweise waren auch hierunter zwei Transkripte, deren Regulation weder durch RU486 noch durch Spironolacton gehemmt wurde.

Aufgrund der Ergebnisse zur frühen Aldosteron-induzierten Expression wurden vier Gene (RGS3, GRK5, GDI2, ARL7) ausgewählt, deren mögliche Beteiligung an Aldosteronwirkungen in distalen Nierenzellen näher untersucht werden sollte. Diese Gene waren zum einen alle signifikant durch Aldosteron reguliert worden, zum anderen erschien aufgrund von Datenbankrecherchen und publizierten Informationen über Signalwege ein Einfluss dieser Gene auf MR-Signalwege sehr wahrscheinlich.

<i>Gen</i>	<i>Regulation</i>	<i>Faktor</i>
ARL7	↑	2,52
GDI2	↑	2,00
RGS3	↓	0,36
GRK5	↓	0,14

Tabelle 1 Differentiell exprimierte Gene im Mikroarray

RGS3, GRK5 und GDI2 sind an der Regulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) beteiligt (vgl. Kap. 1.2). Ein vielschichtiger Crosstalk zwischen nukleären Rezeptoren und GPCRs, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Adenylylcyclase/cAMP-Systems spielen, wurde mehrfach beschrieben. Auch ein Crosstalk der genomischen MR-Wirkung mit anderen zellulären Signalwegen wurde postuliert und im Falle der Adrenorezeptoren, die der Gruppe der GPCRs angehören, auch nachgewiesen. Zum Beispiel zeigten Christ et al.⁴⁶, dass eine Überexpression des MR in distal tubulären RC.SV3 Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Isoproterenol induzierten cAMP Bildung sowie zu einer herabgesetzten Expression von GRK3 führte. Massaad et al.⁴⁷ führten den Nachweis einer synergistischen Aktivierung der liganden-abhängigen MR transaktivierenden Eigenschaften durch die cAMP-induzierte Stimulation von Proteinkinase A.

RGS-Proteine (Regulators of G-protein signalling) bewirken durch eine Erhöhung der GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen eine schnellere Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch die Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ reassoziieren. Folglich wird das G-Protein-abhängige Signal schneller beendet. Die bisher bekannten mehr als 30 Mitglieder dieser Familie werden in 6 Subfamilien unterteilt. **RGS3** gehört neben RGS2 und RGS4 zur R4-Unterfamilie und stellt mit einem Molekulargewicht von ~70kDa im Vergleich zu den anderen Mitgliedern ein ziemlich großes Protein dar. Neben dem 70kDa großen Protein konnte im Herzen zudem eine kürzere Variante mit einem Molekulargewicht von ~25kDa nachgewiesen werden (RGS3S)⁴⁸. RGS3 wird in zahlreichen Organen exprimiert, darunter in Herz, Skelettmuskel, Leber, Lunge und Gehirn. Die höchste Expression zeigt RGS3 jedoch in der Niere. Die Expression von RGS3 in der Niere ist höher als die aller anderen Mitglieder der RGS-Familie in diesem Organ⁴⁹.

G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (**GRKs**) phosphorylieren spezifisch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) an der zytosolischen Oberfläche der Plasmamembran, nachdem diese einen Agonisten gebunden haben. Dies führt zur Rezeptor-Desensibilisierung. **GRK5** wird in zahlreichen Geweben, auch in der Niere, exprimiert.

GDI2, das der Gruppe der *GDP-dissociation inhibitors* angehört, verhindert die Aktivierung von monomeren GTPasen, indem es die Dissoziation von GDP von der GTPase hemmt. Dieses Gen wird konstitutiv in zahlreichen Geweben wie Gehirn, Skelettmuskel und Pankreas exprimiert, jedoch nur sehr gering in der (Gesamt-)Niere⁵⁰. Daten für einzelne Zelltypen liegen nicht vor. GDIs können u.a. die Aktivität von Rab-GTPasen, die für Transport, Beweglichkeit, Andocken und Fusion von Vesikeln verantwortlich sind, modulieren^{51,52}. Damit könnte eine Rolle von GDIs im Vesikel-Trafficking postuliert werden.

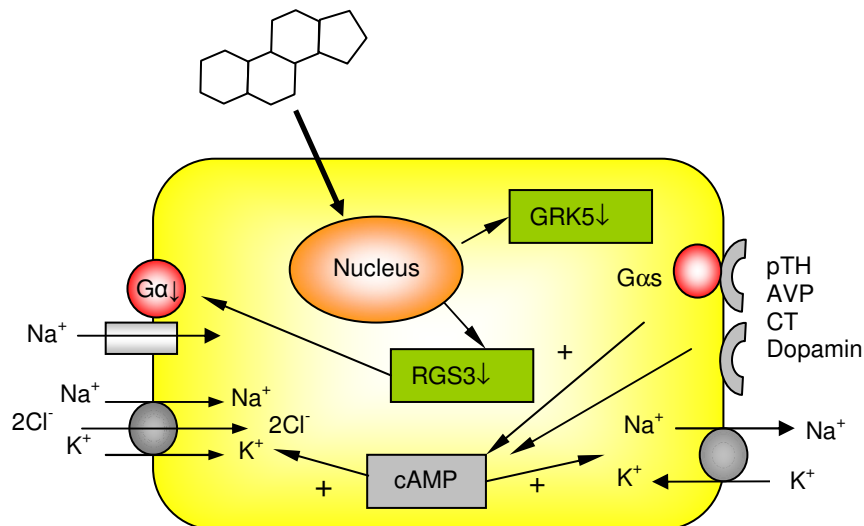


Abbildung 15 Mögliche Aldosteron-induzierte Regulationsmechanismen im distalen Tubulus

Nach Aktivierung durch Aldosteron wandert der MR in den Zellkern und wirkt dort als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor. Dies führt zur Regulation der Genexpression von apikalem Natriumkanal ENaC und basolateraler Na⁺/K⁺-ATPase. Die erhöhte Expression von ENaCs an der apikalen Membran ist sowohl auf Neusynthese als auch auf eine verstärkte Translokation von Vesikeln an die Membran zurückzuführen. Dieser Vesikeltransport wird unter anderem durch das Enzym Nedd4-2 reguliert (vgl. Kap. 1.4.2). Sehr wahrscheinlich sind aber noch andere Proteine in dieses Trafficking involviert. An der Translokation des ENaC aus intrazellulären Pools an die Membran könnte eventuell GDI2 beteiligt sein, da bekannt ist, dass GDIs modulierend in das Trafficking von Vesikeln eingreifen. Dies wird durch Beobachtungen unterstützt, dass das Trafficking des ENaC durch monomere GTPasen moduliert wird⁵³⁻⁵⁵.

Eine weitere Proteinfamilie, von der bekannt ist, dass sie eine entscheidende Rolle im Vesikel-Trafficking einnimmt, sind ARFs (ADP-ribosylation factors), ras-verwandte monomere GTPasen. Zu dieser Gruppe zählt auch **ARL7** (ADP-ribosylation like factor 7). Über dieses Protein im Speziellen ist noch sehr wenig bekannt. ARFs regulieren verschiedene zelluläre Funktionen wie Vesikel-Trafficking, Endocytose und die Aktivität der Phospholipase D. Die höchsten ARL7-Konzentrationen wurden im Gehirn gefunden; in niedrigeren Konzentrationen kommt es außerdem in Milz, Thymus, Magen, Darm und Uterus vor⁵⁶. In der Niere wurde es bisher nicht beschrieben.

Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

Protein-Wechselwirkungen bilden einen wichtigen Regulationsmechanismus der Zelle, da Proteinkomplexe an vielen zellulären Reaktionen beteiligt sind, wie z.B. enzymatischen Reaktionen, Signaltransduktionskaskaden oder der DNA- und RNA-Synthese. Die allerwenigsten Proteine arbeiten völlig alleine, so dass die Untersuchung von Protein-Interaktionen eine entscheidende Rolle in der Charakterisierung von Proteinen darstellt. Im Folgenden werden drei häufig verwendete Methoden beschrieben, die zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden.

Yeast-Two-Hybrid

Die 1989 von Fields und Song⁵⁷ entwickelte Yeast-Two-Hybrid-Technik wird in *Saccharomyces cerevisiae*, der Bäckerhefe, durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Protein („Bait“) mit der DNA-Bindungsdomäne (BD), ein anderes („Prey“) mit der Aktivierungsdomäne (AD) eines Transkriptionsfaktors fusioniert. Bait und Prey werden über verschiedene Plasmide in einer Zelle exprimiert, welche ein oder mehrere Reportergene mit einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor besitzen. Binden diese beiden „Hybride“ aneinander, entsteht ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor, wodurch die Reportergene exprimiert werden können. Interagieren die beiden Fusionsproteine hingegen nicht miteinander, so bleibt der Transkriptionsfaktor inaktiv, da die AD nicht an die spezifischen DNA-Erkennungssequenzen gebracht wird. Zum Screening von Interaktionspartnern eines Bait-Proteins werden DNA-Fragmente aus DNA-Bibliotheken an die AD fusioniert.

Dieses System bringt einige Nachteile mit sich. Da die Interaktionen im Zellkern stattfinden müssen, kann der klassische Yeast-two-hybrid-Assay z.B. nicht für Membranproteine verwendet werden⁵⁸. Zudem können nur direkte Interaktionen nachgewiesen werden, es sei denn, es werden mehrere Screenings nacheinander durchgeführt. Das größte Problem dieses Verfahrens liegt jedoch darin, dass diese Methode unter den zahlreichen untersuchten Klonen einen sehr hohen prozentualen Anteil (~50%) falsch-positiver Klone mit sich bringt⁵⁹. Besser und aussagekräftiger, aber auch aufwendiger, ist daher die Ermittlung möglicher Interaktionspartner auf der Proteinebene.

Affinitätschromatographie

Bei dieser Methode wird das gesuchte Protein zusammen mit seinen interagierenden Proteinen spezifisch an eine Säulenmembran gebunden, während unspezifische Proteine durch einen Waschschrift unter milden Bedingungen entfernt werden. Selektiv an die Säule gebundene Proteine können anschließend z.B. durch starke Veränderung der Ionenstärke, des pH-Werts, durch Detergentien oder durch ein Substrat, das eine noch höhere Affinität zur Säulenmatrix besitzt als das gesuchte Protein, eluiert werden.

Häufig werden die „Bait“-Proteine hierfür als Fusionsproteine an einen geeigneten Fusions-Tag gekoppelt, z.B. Streptavidin-, His₆-Tag oder Glutathion-S-Transferase (GST). Gebundene Proteine können dann einfach zusammen mit dem „Bait“-Protein eluiert werden.

Zur Identifizierung werden die eluierten Proteine über ein- (SDS-PAGE) oder zweidimensionale (2D-Gelelektrophorese) Gele aufgetrennt. Die Gele können anschließend mit Coomassie oder Silber gefärbt werden und einzelne Banden oder Spots ausgeschnitten werden. Nach einem Trypsinverdau der Gelstücke können die Proteine massenspektrometrisch über Peptidmassen-Fingerprint (MALDI-TOF-Massenspektrometrie) und anschließendem Datenbankabgleich identifiziert werden. Falls bestimmte Interaktionspartner des untersuchten Proteins bereits bekannt sind oder vermutet werden, können diese im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Co-Immunpräzipitation

Bei einer Co-Immunpräzipitation werden interagierende Proteine mittels spezifischer Antikörper in kleinen Mengen aus Zelllysaten isoliert. Ein spezifischer Antikörper gegen das Protein, für das Interaktionspartner gesucht werden, wird an z.B. immobilisiertes Protein A oder G gebunden, zum Zellextrakt gegeben und bindet so über seinen konstanten Fc-Teil den Proteinkomplex. Der Komplex wird gewaschen und eluiert. Anschließend können die isolierten Proteine über SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und anschließende massenspektrometrische Analyse nachgewiesen werden. Falls kein spezifischer Antikörper gegen das „Bait“-Protein vorhanden ist, kann dieses mit einer Affinitätssequenz fusioniert werden. Der Proteinkomplex kann dann mit einem spezifischen Antikörper, der gegen den Tag gerichtet ist, isoliert werden.

2.2 Fragestellungen

2.2.1 Nähere Charakterisierung ausgewählter Aldosteron-induzierter Gene

Da die initialen Arbeiten von Dr. M. Kellner mit der recht hohen Aldosteron-Konzentration von 100nM durchgeführt worden waren, sollten diese Ergebnisse mit niedrigeren, physiologischen Aldosteron-Konzentrationen mittels real-time PCR überprüft werden.

Humane distale tubuläre Epithelzellen (DTECs) wurden freundlicherweise von Dr. P. Baer (Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Aufgrund der schwierigen Handhabung dieser Primärzellen sollten alle Versuche zunächst im Modellsystem M1, einer murinen Sammelrohr-Zelllinie, etabliert werden. Die zellulären Wirkungen der vier ausgewählten Gene GDI2, GRK5, ARL7, und RGS3 sollten zunächst durch Überexpression in M1 überprüft und im Folgenden die hieraus gewonnenen Erkenntnisse und ermittelten Bedingungen in Versuchen mit DTEC umgesetzt werden.

2.2.2 Nähere Charakterisierung des Mineralocorticoid-Rezeptors und Identifizierung interagierender Proteine

Untersuchungen an verschiedenen Steroidrezeptoren haben gezeigt, dass Kofaktoren eine wichtige Rolle für die Wirkung von Steroiden spielen.

Liganden rufen am Rezeptor unterschiedliche Konformationsänderungen hervor, welche wiederum eine differentielle Rekrutierung von Kofaktoren bewirken. Während diese Rekrutierung von Kofaktoren für die meisten Steroidrezeptoren relativ gut untersucht ist, ist beim Mineralocorticoid-Rezeptor hierüber bisher wenig bekannt.

Mögliche Interaktionspartner des Mineralocorticoid-Rezeptors sollten daher mit Hilfe von Affinitätschromatographie und anschließender massenspektrometrischer Untersuchung identifiziert werden.

Hierfür sind verschiedene Vorversuche zur Ermittlung des optimalen Systems notwendig. Die Isolierung von MR-Komplexen sollte parallel mittels verschiedener Affinitätssequenzen verglichen werden. Hierfür sollten mehrere MR-Konstrukte hergestellt werden, die C-terminal mit einer Affinitätssequenz fusioniert sind. Im Anschluss sollte von dem System, das bei einem niedrigen Hintergrund die größte Menge an Präzipitat liefert, zusätzlich ein N-terminal fusioniertes Konstrukt angefertigt werden. Mit beiden Konstrukten (N- und C-terminal) sollten schließlich Versuche im Großmaßstab durchgeführt werden.

Zusätzlich sollte durch Stimulierung mit verschiedenen Liganden überprüft werden, ob die isolierten Proteine Liganden-abhängig mit dem MR interagieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

3.1.1.1 Primärantikörper

Produkt	Beschreibung	Hersteller
Anti-MR 1-18 6G1	Maus monoklonal	Dr. C. Gomez-Sanchez ⁶⁰
Anti-GFP	Mischung aus 2 monoklonalen Maus-Antikörpern IgG _{1,κ}	Roche
Anti-PP2Ac	Ziege polyklonal	IBABioTAGnology
Strep-Tactin HRP Konjugat		IBABioTAGnology
Streptavidin HRP		Amersham
Anti-Flag-M2	Maus monoklonal IgG1	Sigma

Tabelle 2 Primärantikörper

3.1.1.2 Sekundärantikörper

Produkt	Hersteller
Rabbit-anti-mouse HRP	Dako
Rabbit-anti-goat HRP	Dako

Tabelle 3 Sekundärantikörper

3.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme	NEB, Invitrogen
Alkalische Phosphatase	Stratagene
Fast Start Taq DNA-Polymerase	Roche
PfuUltra High-Fidelity DNA-Polymerase	Stratagene
T4 DNA Ligase	Invitrogen, NEB
T4 Polynukleotid Kinase	Gibco

3.1.3 Kits und Marker

One-Strep-Kit	IBA BioTAGnology
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
HiSpeed Plasmid Midi Kit	QIAGEN

QIAfilter Plasmid Mega Kit	QIAGEN
QIAfilter Plasmid Giga Kit	QIAGEN
QIAEX II Gel-Extraction Kit	QIAGEN
1kb DNA-Marker	Invitrogen
High DNA Mass Ladder	Invitrogen
Prestained Marker	Invitrogen
ECL [®]	Amersham Pharmacia
Lumilight [®] Plus	Roche
BD PowerScript [™] Reverse Transcriptase	Clontech
Zero Blunt TOPO Cloning Kit	Invitrogen
Steady-Glo [®] -Luciferase-Reagenz	Promega

3.1.4 Radioaktiv markierte Substanzen

[³ H] Thymidin	Amersham Pharmacia
[³ H] Leucin	Amersham Pharmacia
[¹²⁵ I] cAMP	Amersham Pharmacia

3.1.5 Geräte

CO ₂ -Brutschrank	Heraeus
Mikroskop	Zeiss
Westernblot-Apparatur	Bio-Rad
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Biometra
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Chemilmager	Alpha Innotec
Thermoblock	Biometra
Labor-pH-Meter 766	Knick
Schüttelinkubatoren	B. Braun
Sicherheitswerkbank	Heraeus
Mastercycler Gradient [™]	Eppendorf
GeneQuant [®] pro	Amersham Pharmacia
EVOM Epithelial Voltohmmeter	World Precision Instruments Ltd
LightCycler	Roche

3.1.6 Medien, Lösungen, Puffer

Ethidiumbromid Lösung 10mg/ml	Invitrogen
2x-HBS-Puffer	8,18% (w/v) NaCl, 5,94% (w/v) Hepes, 0,2% (w/v) Na ₂ HPO ₄ (pH7,1)
Glo-Lysis-Puffer	Promega
Galaktosidase-Puffer	0,2M Phosphatpuffer (pH7,3); 2mM MgCl ₂ ; 1,33mg/ml ONPG; 100mM β-Mercaptoethanol
Probenpuffer für DNA (6x)	0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol FF; 30% Glycerol in H ₂ O
RIPA-Puffer	50mM Tris, 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% NP-40; 1mM PMSF; 1 Complete-Tablette auf 50ml Puffer
LB-Medium	10g Bacto-Trypton; 5g Bacto-Yeast-Extrakt; 10g NaCl; ad 1l H ₂ O; mit 5N NaOH auf pH 7,0 einstellen
TBS (10x)	1,5M NaCl, 30mM KCl, 250mM Tris, pH 7,4
TBS-T (10x)	1,5M NaCl, 30mM KCl, 250mM Tris, 0,5% Tween 20; pH 7,4
ΨB-Medium	5g/l Hefeextrakt; 20g/l Casein-hydrolysat; 4g/l MgSO ₄ ; 10mM KCl (pH7,6)
TBE-Stocklösung (5x) (Tris-Borat-EDTA)	54g/l Tris; 27,5g/l Borsäure; 20ml/l 0,5N EDTA (pH8,0)
Szintillationslösung	Quickszint (Zinsser, Frankfurt)
2x-Probenpuffer	65mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 25% Glycerol, 5% 2-Mercaptoethanol
Elektrophoresepuffer (5x)	15,1g Tris, 5,0g SDS, 72,0g Glycin in 1l Aqua bidest.
Transferpuffer	14,3g Tris, 3,03g Glycin, 200ml Methanol, ad 1l Wasser
Ponceau S Lösung	0,2% (w/v) in 3% Trichloressigsäure
Coomassie Lösung	0,1% Coomassie brilliant blue R250 in 10% Essigsäure, 40% EtOH, 50% Wasser
Puffer P1 (Qiagen)	50mM Tris-Cl, (pH 8,0), 10mM EDTA, 100µg/ml Rnase A
Puffer P2 (Qiagen)	200mM NaOH, 1% SDS
Puffer P3 (Qiagen)	3M Kaliumacetat, pH5,5
Puffer QBT (Qiagen)	750mM NaCl, 50mM MOPS (pH 7,0), 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100

Puffer QF (Qiagen)	1,25M NaCl, 50mM Tris (pH 8,5), 15% Isopropanol
Puffer QC (Qiagen)	1M NaCl, 50mM MOPS (pH7,0), 15% Isopropanol
Puffer FWB2 (Qiagen)	1M Kaliumacetat (pH5)
Waschpuffer W (für Strep-Tactin-Säule)	100mM Tris-Cl (pH 8,0), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT, 10mM Ammoniummolybdat
Regenerierungspuffer R (für Strep-Tactin-Säule)	100mM Tris-Cl (pH 8,0), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM HABA (Hydroxy-azo-phenyl-benzoesäure)
Elutionspuffer E (für Strep-Tactin-Säule)	100mM Tris-Cl (pH 8,0), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT, 10mM Ammoniummolybdat, 2,5mM Desthiobiotin
Triton X-100 Lysis-Puffer:	50mM Tris-HCl (pH 7,5), 100mM NaCl, 50mM NaF, 5mM EDTA, 40mM β -Glycerophosphat, 200 μ M Na-orthovanadat, 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 5mM DTT, 10mM Ammoniummolybdat, 1 Tablette Complete [®] Proteaseinhibitor auf 50ml Puffer
5X-SDS-PAGE-Sample-Buffer	0,25M Tris-Cl (pH 8,0), 25% Glycerol, 7,5% SDS, 12,5% 2-Mercaptoethanol, 0,25mg/ml Bromphenolblau
PSS-Puffer	135mM NaCl, 5mM KCl, 1,5mM CaCl ₂ , 0,8mM MgCl ₂ , 55mM Glukose, 10mM HEPES, pH7,4

Tabelle 4 Verwendete Lösungen und Puffer

3.1.7 Verbrauchsmaterial

Eppendorf-Gefäße, Pipettenspitzen	Eppendorf
Filterpapiere	Schleicher & Schüll
Kryogegefäße	Greiner
Protran Nitrocellulose-Membranen	Schleicher & Schüll
Sterilfilter	Schleicher & Schüll
Zellkulturflaschen	Greiner, BD
Zentrifugenröhrchen (Falcon)	BD
Transwell [®] Permeable Supports	Corning Costar

3.1.8 Chemikalien, sonstige Reagenzien

Acrylamid-Lösung	Roth
Antibiotika-Stocklösungen	
▪ Ampicillin	Invitrogen
▪ Kanamycin	Invitrogen
Epoxomicin	Biomol
β-Galaktosidase	Promega
TEMED	Sigma
Aldosteron	Sigma
Spironolacton	Sigma
Cortisol	Sigma
Carbenoxolon	Sigma
Dopamin	Fluka
Parathormon (PTH)	Bachem
Vasopressin	Bachem
Isoprenalin	Fluka
Calcitonin	Bachem

3.1.9 Zellkultur

FuGene 6 Transfektionsreagenz	Roche
Trypsin-EDTA 10x-Lösung	Invitrogen
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom
Steroidfreies Fötale Kälberserum	ccpro
PBS	Invitrogen
DMEM	Invitrogen
DMEM-F12	Invitrogen
M199	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
Penicillin/Streptomycin 5000IU/ml/5000 µg/ml	Invitrogen
Meronem	AstraZeneca
Zeocin	Invitrogen

3.1.10 Eukaryotische Zellen3.1.10.1 Primärkulturen

DTEC	Dr. P. Baer, Universität Frankfurt
------	------------------------------------

3.1.10.2 Zelllinien

M1	ATCC/ECACC
HEK293T	ATCC

3.1.11 Bakterienstämme

E. coli XL1-blue	Stratagene
E. coli JM 109	Stratagene
One Shot Chemically E.coli	Stratagene

3.1.12 Plasmide

pcDNA3.1/Zeo	Invitrogen
pEXPR-IBA 103/105	IBABioTAGnology
pCR-BluntII-TOPO	Invitrogen
pCR2.1	Invitrogen
pEGFP	Clontech
pEGFP-hMR	Dr. M. Lombès, Paris
MMTV-Luc	Dr. A. Cato, Karlsruhe
pSV- β -Galaktosidase-Vektor	Promega
phMR3750	Dr. R. Evans, San Diego
pcDNA3-GRK5	Dr. J. Benovic, Philadelphia

3.1.13 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'
Oligonukleotide für Kassetten:	
BiotinTag sense NheNot	CTAGCATGGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAA GATCGAGTGGCACGC
BiotinTag antisense NotNhe	GCGGCCGCGTGCCACTCGATCTTCTGGGCCTCGAAGA TGTCGTT CAGGCCATG
BiotinTag sense Kozak NheNot	CTAGCGCCACCATGGGCCTGAACGACATCTTCGAGGC CCAGAAGATCGAGTGGCACGC
BiotinTag antisense Kozak NotNhe	GCGGCCGCGTGCCACTCGATCTTCTGGGCCTCGAAGA TGTCGTT CAGGCCATGGCGGCG
FlagTag sense NheNot	CTAGCGCCGCCATGGATTACAAGGATGATGATGATAA GGC
FlagTag antisense NotNhe	GGCCGCCTTATCATCATCATCCTTGTAAATCCATGGCGG CG
IBA:	
hMR IBA 103 for	ATATATGGTCTCGAATGGAAACCAAAGG
hMR IBA 103 rev	TATGACGGTCTCAGCGCTCTTCCGGTGGAAGTA
hMR IBA 105 for	ATATATGCGCCGAGACCAAAGGCTACCAC
hMR IBA 105 rev	TATGGTCTCATATCTCACTTCCGGTGGAAGTA

Sequenzierprimer:	
pEXPR-IBA Forward	GAGAACCCACTGCTTACTGGC
pEXPR-IBA Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
pEXPR-IBA Mitte1	TCTCCTCTCTCAAGTCCGTT
pEXPR-IBA Mitte2	GTATTAACAAGAACCAGAT
RatMR Anfang	CAGAGGCTCAAGGTCACACA
RatMR Mitte	GGAAGGGCAACACAACACTATCTGT
Primer für in vitro-Mutagenese rMR:	
rMRMut1933sense	TGGTAGCTGCGAGGACAGCGCATTCCCAG
rMRMut1933antisense	CTGGGAATGCGCTGTCCTCGCAGCTACCA
rMRMut2785/86sense	CTCAACCGCCTGGCAGCGAAACAGATGATCCAGG
rMRMut2785/86antisense	CCTGGATCATCTGTTTCGCTGCCAGGCGGTTGAG
rMRMut3214sense	AACAGTTCTGGACAGAGTTGGCAGAGGTTCTAC
rMRMut3214antisense	GTAGAACCTCTGCCAACTCTGTCCAGAACTGTT
Primer für die konventionelle / Real-time-PCR:	
MR sense Not	ATAGCGGCCGCGGAAACCAAAGGCTA
MR antisense Kpn	ATAGGTACCTCACTTTCTGTGAA
GAPDH sense	CAGCCTCAAGATCATCAGCAATGC
GAPDH antisense	AGACCACCTGGTGCTCAGTGTAG
sgk sense	GCTTCCTGGAACCACGGGCTCGTT
sgk antisense	CAGCATCTCATACAAGACAGCTCC
RGS-3 sense	AGAACCCTGTCCAGCAAAGACTCAG:::ACC
RGS-3 antisense	CAGTAAGGGCCTTGGCTGGCAGGGAGAC
GDI2 sense	GGTTGTGTGCATCTGTCCTCTTGAG:::TTC
GDI2 antisense	CCGCTTTATGTTTCGCTTCCTCTCCCC:::CTC
hCT sense	CTGGGATTGCAGGCGTGAGCCACTTTCC
hCT antisense	GAAGGTGTCACCTCCTTGAGATAAGGCTGAG
mCT sense	GACTGACTCCTCAATCTC
mCT antisense	ACCGGTAGCCCTGCAT
ARL7 sense	CTCTACCGGCTCAAGTTCAACGAGTTC
ARL7 antisense	CCTGGTTCTCGGCGAACTTGGTCAC
GRK5 sense	GGGCCTTGTTTTATGCGGCAGAGATCCTCTG
GRK5 antisense	CTCGATCATCTCATAGATGAGGCAGCCAAGG

Tabelle 5 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Bei der Kultivierung von Zellen unterscheidet man entsprechend dem Zellpopulationstyp zwischen Primärzellen und Zelllinien.

3.2.1.1 Kultivierung von Primärzellen

Distale tubuläre Epithelzellen (DTECs) wurden von Dr. P. Baer (Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Bei diesen Primärkulturen handelt es sich um die Kultivierung von Nierenzellen, die aus dem dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife und dem frühen distalen Tubulus entnommen wurden.

DTECs wurden aus humanem renalen Gewebe durch Kollagenase-Verdau und eine Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen. Hierfür wurde eine immunomagnetische Methode angewandt, bei der so genannte MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) Mikropartikel verwendet wurden. Bei diesen handelt es sich um ca. 50nm große magnetische Partikel, die an spezifische monoklonale Antikörper gebunden sind. DTECs wurden hierbei mit Hilfe von einem monoklonalen Antikörper gegen Tamm-Horsfall-Glykoprotein (THG), einem spezifischen Antigen für den dicken aufsteigenden Ast und den frühen distalen Tubulus, isoliert⁶¹.

Nach dem ersten Passagieren der Zellen wird eine Primärkultur als Primärzelllinie bezeichnet. DTECs können im Allgemeinen nur bis zu 7 oder 8 Subkulturen in Kultur gehalten werden. Danach gehen sie in Apoptose über oder verlieren ihre spezifischen Eigenschaften. Bei DTECs ist in Kultur eine De- sowie eine Transdifferenzierung beschrieben worden. Neben dem Verlust der Expression von Tamm-Horsfall-Glykoprotein beginnen die Zellen für den proximalen Tubulus charakteristische Markerproteine zu synthetisieren⁶².

DTECs wurden in Medium M199-Medium mit 10% fötalem Kälberserum und 200µg/ml Meronem bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellkulturflaschen waren zuvor mit Kollagen IV-Lösung (0,5M in Essigsäure) und mit FKS beschichtet worden.

3.2.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Im Gegensatz zu Primärkulturen handelt es sich bei Zelllinien um einen zeitlich unbegrenzt kultivierbaren Zellpopulationstyp. Diese Linien entstehen entweder durch Immortalisierung oder stammen von Tumorzellen ab.

Vorteile von Zelllinien liegen vor allem in einer einfachen Kultivierung und Passagierung. Allerdings kann auch dieser Populationstyp mit steigenden Passagen viele Eigenschaften des Ursprungsgewebes verlieren.

Alle Zelllinien wurden zur Kultivierung in Zellkulturflaschen ohne Antibiotikum kultiviert. Dies hat den Vorteil, dass latente Kontaminationen sofort erkannt werden können. Zur Kultivierung auf Kulturschalen im Großmaßstab wurde dem Medium Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

HEK293T-Zellkultur

HEK293 Zellen sind eine durch Transfektion mit Adenovirus 5 DNA entstandene permanente Linie von humanen embryonalen Nierenzellen⁶³. HEK293T Zellen stellen ein Derivat der 293 Zelllinie dar. Sie haben das Gen für das SV40 large T Antigen stabil ins Genom integriert. Plasmide, die einen SV40 Replikationsursprung aufweisen, werden mit hoher Effizienz repliziert⁶⁴. HEK293T Zellen zeichnen sich durch eine gute Transfizierbarkeit aus.

Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium mit 10% fötalem Kälberserum bei 37°C und 5% CO₂. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen nach Ablösen mit Trypsin-Lösung im Verhältnis 1:10 auf neue Zellkulturflaschen überführt.

M1-Zellkultur

M1-Zellen sind eine Sammelrohr-Zelllinie der Maus, die durch Immortalisierung mit SV40 entstanden ist. Die Kultivierung von M1-Zellen erfolgte in DMEM-F12 Medium mit 10% fötalem Kälberserum bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:20 auf neue Kulturflaschen gesplittet.

3.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren von M1 erfolgte in 90% FKS und 10% DMSO. Das Einfrieremedium für HEK293T-Zellen setzte sich aus DMEM mit 20% FKS und 10% DMSO zusammen. DMSO diffundiert in die Zellen und verhindert beim Einfrieren Kristallbildungen und somit eine mögliche Zerstörung der Zellmembran.

Die Zellen wurden im Einfrieremedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Box 1°C pro Minute auf -80°C herunter gekühlt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstoff entnommen und zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden in mit 37°C warmem Medium gefüllte Kulturflaschen überführt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Anheften der Zellen wurde das Medium ausgetauscht, um das DMSO aus dem Einfrieremedium zu entfernen.

3.2.1.4 *Transfektion eukaryotischer Zellen*

Bei dem Einbringen von DNA in Zellen unterscheidet man zwischen transienter und stabiler Transfektion. Das Plasmid wird dabei entweder nur zeitweilig (transient) oder dauerhaft (stabil) ins Genom der Wirtszelle integriert. Bei einer stabilen Transfektion kann das fremde Gen konstant exprimiert werden. Die Information geht so nicht, wie bei einer transienten Transfektion üblich, im Verlauf mehrerer Zellteilungen verloren. Mit Hilfe von Resistenzgenen im eingeführten Plasmid können transfizierte Zellen über ihre Antibiotikum-Resistenz selektioniert werden.

3.2.1.4.1 *Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGene 6*

Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Transfektionsmethode mit FuGene 6 liegt das Prinzip der Lipofektion zugrunde.

Die Zellen wurden trypsinisiert, in frisches Medium aufgenommen, auf 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert, so dass sie am darauf folgenden Tag eine Zelldichte von ca. 50-60% erreicht hatten. Vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Zum Austesten der optimalen Transfektionsbedingungen wurden die Verhältnisse 3:1, 3:2, 6:1 und 6:4 von DNA zu FuGene 6 verwendet. Serumfreies Medium und FuGene 6 wurden gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Reagenz direkt ins Medium pipettiert wurde und nicht in Kontakt mit der Wand des Eppendorf-Gefäßes kam. Nach fünf Minuten wurde die DNA hinzugefügt und die Inkubation für weitere 15 Minuten fortgeführt. Danach wurde der Komplex tropfenweise auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.4.2 *Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Calcium-Phosphat*

Zur Herstellung der Präzipitate wurden je 15cm-Kulturschale 87,5µl CaCl₂-Lösung (2,5M) mit 17,5µg DNA versetzt und auf ein Endvolumen von 875µl mit Wasser aufgefüllt. Diese Lösung wurde langsam und unter permanentem Schütteln (Vortex) zu 875µl 2x-HBS-Puffer gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Mischung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Das durch Mischen von CaCl₂ und Na₂HPO₄ entstandene Calciumphosphat bildet mit der DNA ein Präzipitat, welches sich an der Oberfläche der Zellen anlagert und schließlich über Endocytose in die Zellen aufgenommen wird. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung nicht aufgenommener DNA-Präzipitate wurde das Medium entfernt. Nach zwei Waschschrritten mit Medium und PBS wurden die Zellen mit frischem DMEM-Medium überschichtet und für weitere 48h bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

3.2.1.4.3 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

Um die effizientesten Transfektionsbedingungen zu ermitteln, wurden die Zellen vorab transient transfiziert. Entsprechend den festgestellten optimierten Bedingungen erfolgte die Transfektion der einzelnen Plasmide mit FuGene 6 in M1-Zellen (s. Kap. 3.2.1.4.1). Nach 48 Stunden wurde die Selektion mit 300µg/ml Zeocin (für pcDNA3.1/Zeo) gestartet. Die letale Konzentration wurde zuvor für nicht transfizierte Zellen in einer Dosis-Wirkungskurve ermittelt. Nachdem auf der Kontrollplatte keine lebenden Zellen mehr zu erkennen waren, wurden die überlebenden Zellen trypsiniert, gezählt und auf 96-Well-Platten ausgesät. Dabei wurden pro Well 0,5 Zellen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen nacheinander auf 24- und 6-Well-Schalen, danach auf Flaschen transferiert. Der Selektionsdruck wurde bis zum Einfrieren der Zellen erhalten.

3.2.2 Nukleinsäure-Techniken

3.2.2.1 RNA-Isolierung

Die Zellen wurden einen Tag vor der RNA-Isolierung jeweils so auf eine 25cm²-Kulturflasche ausgesät, dass sie am nächsten Tag 50-60% Konfluenz erreicht hatten. Die Zellen wurden mit Aldosteron in den Konzentrationen 1, 10 und 100nM stimuliert und nach zwei Stunden geerntet.

Nach Abziehen des Mediums und Waschen mit PBS wurde jede Flasche 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1ml Trizol[®] inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und in ein RNase-freies Eppendorf-Tube überführt. Die Zellsuspension wurde durch eine graue Kanüle gedrückt und im Anschluss mit 200µl Chloroform versetzt, 15 Sekunden geschüttelt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 15 Minuten bei 4°C und 12.000g wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert. Diese wurde mit 500µl Isopropanol und 1µl Glykogen 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4°C und 12.000g wurde das Pellet mit 1ml 75% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 15µl DEPC-Wasser gelöst und abschließend 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Die RNA-Konzentrationen wurden durch Messen der Extinktion ermittelt.

3.2.2.2 Reverse Transkription

Für die Synthese von cDNA wurde PowerScript™ Reverse Transkriptase der Firma Clontech verwendet. Hierfür wurden 5µg Gesamt-RNA mit 1µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (0,5µg/µl) in einem Eppendorf-Gefäß vermischt und mit DEPC-Wasser auf 12µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 70°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Durch diesen

Prozess werden die Sekundärstrukturen denaturiert. Anschließend wurden 4µl 5x-First-Strand-Buffer, 2µl dNTPs (jeweils 10mM dATP, dTCT, dGTP, dTTP) , 2µl DTT (100mM) sowie zuletzt 1µl Power-Script Reverse Transkriptase zugegeben und das Ganze 90 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt.

Der Reaktionsansatz wurde mit 180µl DEPC-Wasser auf 200µl aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

3.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Stücke amplifiziert werden. Hierzu werden zwei synthetische Einzelstrang-Oligonukleotide benötigt, die jeweils mit einem Ende der zu amplifizierenden Sequenz hybridisieren.

Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. Im ersten wird die Template-DNA denaturiert, es kommt zur Einzelstrang-Bildung. Im nächsten Schritt, dem Primer-Annealing, wird durch eine Abkühlung auf 50-65°C -abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer-Kombination- die Hybridisierung der im großen Überschuss vorhandenen Primer an komplementäre DNA-Abschnitte ermöglicht. Während der dritten Phase, der Elongation, werden bei 72°C von den Startermolekülen ausgehend neue komplementäre DNA-Sequenzen synthetisiert, welche bei folgenden Zyklen wieder als Template zur Verfügung stehen.

3.2.2.3.1 Konventionelle PCR

Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG bezogen (siehe Tabelle 5) und in H₂O bidest. gelöst. Zur Analyse oder zur Amplifizierung kurzer DNA-Sequenzen wurde Taq-Polymerase verwendet. Für präparative Zwecke, z.B. zur Amplifizierung des Mineralocorticoid-Rezeptors, wurde eine Polymerase mit 3`5`-Proofreading-Aktivität eingesetzt (Pfu Ultra[®] High Fidelity Polymerase, Stratagene).

<u>Ansatz:</u>	50ng	DNA-Template
	2,5µl	10x-PCR-Puffer; inkl. 2mM MgCl ₂
	0-1µl	MgCl ₂ -Stammlösung (25mM)
	0,5µl	DNA-Polymerase (5U/µl)
	0,5µl	Primer forward (20µM)
	0,5µl	Primer reverse (20µM)
	0,5µl	dNTP-Mix (jeweils 10mM)
	ad 25µl	Wasser

Folgendes PCR-Programm wurde standardmäßig angewendet:

<i>PCR-Schritt mit Temperatur</i>		<i>Zeitdauer</i>	
Erst-Denaturierung	95 °C	2-5 Min	
Denaturierung	95 °C	30 Sek	} 20-30 Zyklen
Annealing	50-65 °C 5-10 °C < T _m der Primer	30 Sek	
Elongation	72 °C	1 Min/kb	
Elongation	72 °C	10 Min	
Abkühlen	4 °C		

Tabelle 6 PCR-Programm für eine konventionelle PCR

3.2.2.3.2 Real-time PCR

Die Real-time PCR wurde mit dem Light Cycler der Firma Roche durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer normalen Polymerase-Ketten-Reaktion. Für die Detektion wurde der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR[®]-Green verwendet. Dieser Fluorophor interkaliert sequenzunabhängig mit dem DNA-Doppelstrang. Durch die kontinuierliche Messung der Fluoreszenzintensität, die proportional zur Menge des gebildeten Amplifikationsproduktes ansteigt, kann direkt die synthetisierte DNA-Menge mitverfolgt werden. Die Detektion des Fluoreszenzsignals wurde bei einer Wellenlänge von 530nm durchgeführt. Die Messung erfolgte hierbei immer am Ende der Elongationsphase, da zu diesem Zeitpunkt die DNA doppelsträngig vorliegt.

Im Anschluss an die Amplifikation der DNA-Sequenz wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Bei einer bestimmten Temperatur denaturiert die DNA in Einzelstränge, was einen Abfall der Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Der Schmelzpunkt ist definiert als die Temperatur, bei der 50% der DNA als Einzelstrang vorliegt und ist abhängig von Sequenz, Länge und GC-Gehalt des DNA-Strangs. Über die Analyse des Schmelzpunktes kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der amplifizierten DNA um ein unspezifisches Produkt, z.B. aus Verunreinigungen des PCR-Ansatzes, oder um synthetisierte Nebenprodukte wie Primerdimere handelt.

Die nach Stimulationsversuchen aus DTEC-Zellen isolierte RNA wurde vor der Real-time PCR zunächst unter Verwendung von Reverser Transkriptase (siehe Kapitel 3.2.2.2) in cDNA umgeschrieben, welche als Template für die Real-time-PCR Ansätze diente. Die Magnesiumchlorid-Konzentration wurde für jedes Primerpaar separat bestimmt. Bei jedem Versuch wurde eine Negativkontrolle mitgeführt (PCR-Ansatz ohne DNA).

<u>Ansatz:</u>	2µl	DNA-Template
	0,5µl	Forward primer (20µM)
	0,5µl	Reverse primer (20µM)
	x µl	Magnesiumchlorid (25mM)
	2µl	SYBR® Green Mastermix
	ad 20µl	H ₂ O

Die Light Cycler-Software ermöglicht über die Ermittlung der so genannten *Crossingpoints* eine direkte Berechnung der Ausgangsmenge an cDNA-Template des zu untersuchenden Gens. Aus der Differenz der Crossingpoints zweier Proben kann ein Faktor für die Änderung der Transkriptionsstärke berechnet werden. Als Referenzwert wurde bei allen Versuchen die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH ermittelt.

	Temperatur	Zeit	Temperaturänderung pro Sekunde
Denaturierung	95 °C	30 sec	20 °C
Elongation	95 °C	0 sec	20 °C
	55 °C	5 sec	20 °C
	72 °C	10 sec	20 °C
			50Zyklen
Schmelzkurve	95 °C	0 sec	20 °C
	65 °C	15 sec	20 °C
	95 °C	0 sec	0,1 °C
Abkühlen	40 °C	30 sec	20 °C

Tabelle 7 Light Cycler RT-PCR-Programm

3.2.2.4 PCR-vermittelte in-vitro Mutagenese

Zur gezielten Veränderung von DNA-Sequenzen kann eine In-vitro-Mutagenese durchgeführt werden. Hierzu wurden in einer Amplifikation des gesamten Matrizen-Plasmids mit Pfu-Ultra®-Polymerase zwei komplementäre Primer, welche die gewünschte Mutation enthielten, direkt eingebaut und zu zwei zirkulären DNA-Strängen elongiert. Die beiden Oligonukleotidprimer wurden so gewählt, dass sie eine Länge von 25 bis 45 Basen aufwiesen und die Mutation möglichst zentral innerhalb dieser Sequenz lag.

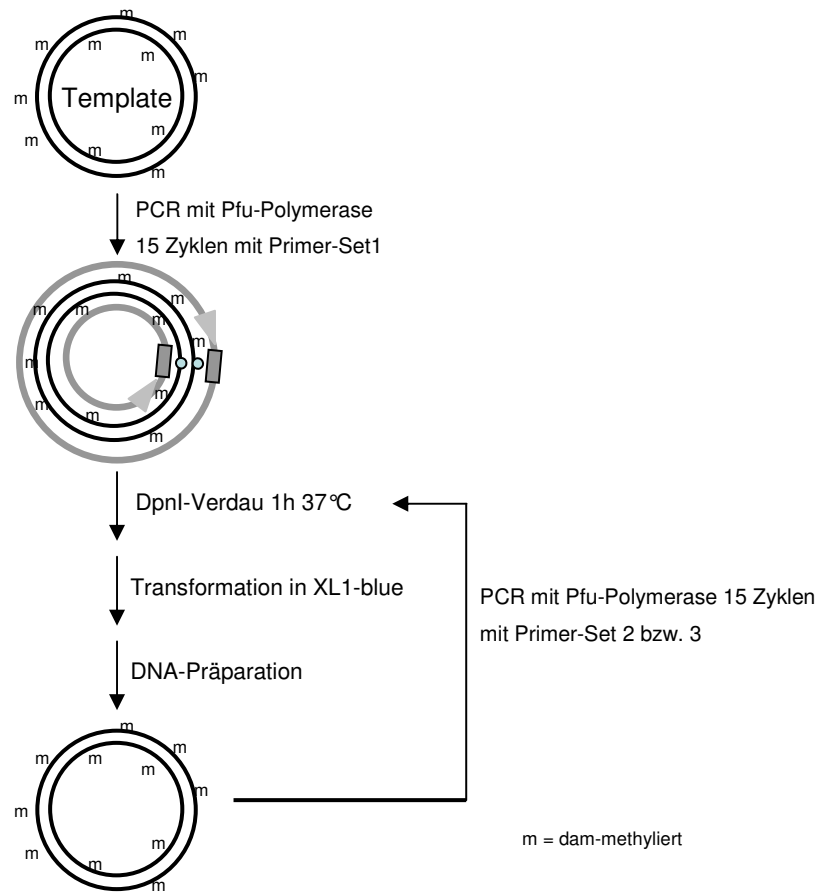


Abbildung 16 Prinzip der multiple site Mutagenese

Plasmid-DNA, die aus den meisten E.coli Stämmen, u.a. XL1blue, isoliert wurde (dam^+), liegt methyliert vor. Das ursprüngliche Plasmid kann daher durch Inkubation mit der Endonuklease DpnI, welche spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA angreift (Target Sequenz 5'-Gm⁶ATC-3'), verdaut werden, ohne gleichzeitig das PCR-Produkt zu schneiden (s. Abbildung 16).

Der PCR-Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

<u>Ansatz:</u>	100ng	Template
	150ng	Primer sense (~15pmol) (s. Tabelle 5)
	150ng	Primer antisense (~15pmol) (s. Tabelle 5)
	200µM	dNTPs
	2,5U	Pfu-Ultra [®] -HF-Polymerase
	1x	Pfu-Ultra-Puffer
	ad50µl	Wasser

<i>PCR-Schritt mit Temperatur</i>		<i>Zeitdauer</i>	
Denaturierung	95°C	30 Sek	} 15 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 Sek	
Annealing	55°C	1 Min	
Elongation	68°C	8 Min	

Tabelle 8 PCR-Reaktion Multiple site Mutagenesis

Nach 15 PCR-Zyklen (PCR-Bedingungen s. Tabelle 8) wurde der PCR-Ansatz auf 4°C abgekühlt und daraufhin eine Stunde bei 37°C mit 1µl (10U) DpnI inkubiert. 1µl des gesamten Verdauansatzes wurden schließlich für eine Transformation in E. coli XL1-blue Zellen eingesetzt. Hierbei wurden die eingeführten Strangbrüche wieder durch bakterielle Reparaturenzyme behoben. Nach Präparation der Plasmid-DNA und einem Kontrollverdau wurde mit der nächsten Mutation entsprechend fortgefahren. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.2.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nukleotide, Primer und Enzyme wurden aus den PCR-Produkten mit dem QIAquick PCR-Purification-Kit® (QIAGEN) entfernt. Hierzu wurden 50µl PCR-Produkt mit 250µl Puffer PB gemischt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Durch einen Zentrifugationsschritt von 60s bei 10.000g wurde die DNA an die Säule gebunden. Es folgte ein Waschschrift mit 750µl Puffer PE. Anschließend wurde die DNA mit 30µl Wasser eluiert.

3.2.2.6 Entfernung von Nukleotiden und Enzymen

Die Entfernung von Nukleotiden und Enzymen erfolgte mittels des QIAquick Nucleotide Removal Kits® (Qiagen). Der Reaktionsansatz wurde mit der 5-fachen Menge Puffer PN gemischt und auf eine QIAquick Säule gegeben. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 6000rpm wurde die Säule mit 750µl Puffer PE gewaschen und erneut eine Minute bei 6000rpm zentrifugiert. Um Ethanolreste aus dem Waschpuffer vollständig zu entfernen, wurde eine weitere Zentrifugation bei 13.000rpm angeschlossen. Im nächsten Schritt wurden 30µl Wasser auf die Säule gegeben, eine Minute bei RT inkubiert und schließlich eine Minute bei 13.000rpm zentrifugiert, um die an die Säule gebundene DNA zu eluieren.

3.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Bei einer Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch die an beiden Enden des Gels angelegte Spannung wird ein elektrisches Feld erzeugt, in dem die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode wandern.

Zum Herstellen der Gele wurde die Agarose in 0,5x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Die auf ca. 60°C abgekühlte Agaroselösung wurde in eine vorbereitete Kammer gegossen. Zu 100ml Agaroselösung wurden 1,5µl der Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) zum Anfärben der DNA zugesetzt und gut gemischt. Zum späteren Auftragen der Proben wurde ein Kamm ins Gel eingesetzt.

Für die Auftrennung größerer DNA-Fragmente wurden 0,8%ige Gele verwendet. Kleinere Fragmente (<1kb) wurden mit 1 oder 1,5%igen Gelen aufgetrennt. Nach vollständiger Erstarrung des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Horizontal-Gel-Apparatur eingebracht. Die Elektrophoresekammer wurde mit 0,5x TBE-Puffer befüllt, so dass das Gel leicht mit Puffer bedeckt war. Zum Beladen des Gels wurde den Proben 6-fach DNA-Probenpuffer zugesetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 100V. Die DNA-Banden konnten durch den Farbstoff Ethidiumbromid auf einem UV-Leuchttisch betrachtet und gegebenenfalls aus dem Gel ausgeschnitten werden.

3.2.2.8 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des *QIAex II Gel Extraction Kits*[®] der Firma Qiagen. Das Prinzip der Extraktion basiert auf der Lösung der Agarose und der anschließenden Bindung der DNA an Glasmilch, einem Silica-Gel, bei einer hohen Salzkonzentration.

Die zu isolierenden DNA-Fragmente aus Restriktionsspaltungen wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte DNA-Bande auf einem UV-Leuchttisch mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Das isolierte Gelstück wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und ausgewogen. DNA-Fragmente unter 4kb Größe wurden mit dem dreifachen Volumen Puffer QX1 versetzt, Fragmente über 4kb zusätzlich mit dem zweifachen Volumen Wasser. Nach Zugabe von 10µl QIAEX II (Glasmilch) wurden die Gelfragmente 10 Minuten bei 50°C unter regelmäßigem Mischen (Vortex) aufgelöst. Anschließend wurde die Glasmilch mit der daran gebundenen DNA für 30 Sekunden bei 10.000g abzentrifugiert, danach einmal mit 500µl Puffer QX1 und zweimal mit jeweils 500µl PE-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und mit 20µl Wasser resuspendiert. In Abhängigkeit von der Größe des isolierten DNA-Stücks folgte eine Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur (<4kb) oder bei 50°C (>4kb). Nach einem letzten Zentrifugationsschritt von 30s bei 10.000g wurde der Überstand, der die aufgereinigte DNA enthielt, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

3.2.2.9 Spezifische Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen

Die DNA (1µg) wurde nach Angaben des Herstellers mit 5U Restriktionsenzym (Invitrogen; New England Biolabs) im entsprechenden Restriktionspuffer versetzt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

<u>Ansatz:</u>	xµl	Plasmid
	2,0µl	Puffer
	0,5µl	Enzym (10U/µl)
	ad 20,0µl	Wasser

3.2.2.10 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um eine Religation linearisierter Plasmide zu vermeiden, wurden diese mit 1µl (70U/µl) Alkalischer Phosphatase 30 Minuten bei 37°C im gleichen Reaktionspuffer erhitzt. Als Enzym wurde „Calf intestine phosphatase“ (CIAP) verwendet. Eine Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen an den Enden der linearisierten DNA verhindert eine erneute Ligation. Die CIAP wurde dann durch 10-minütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert. Um noch eventuell vorhandenes Enzym zu entfernen, wurde die DNA zusätzlich mit Glasmilch gereinigt.

3.2.2.11 Phosphorylierung mit T4 Polynukleotid Kinase

Da bei der enzymatischen Amplifizierung der Biotin- und Flag-Tag Kasette keine phosphorylierten Primer verwendet wurden, musste das Fragment im Anschluss an die PCR phosphoryliert werden.

Hierfür wurden 5pmol der nicht phosphorylierten Kasette zusammen mit 10 Units T4 Polynukleotid-Kinase, 1mM ATP und Reaktionspuffer eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung wurde anschließend ein weiterer Inkubationsschritt von 10 Minuten bei 65°C durchgeführt.

3.2.2.12 Ligation

Die Ligation von DNA erfolgte ATP-abhängig durch die Aktivität der T4-DNA-Ligase, welche 3`OH-Gruppen mit den freien 5`Phosphatenden verknüpft. Nach dem Restriktionsverdau von Vektor und Insert (PCR-Fragment, Plasmid) wurde die geschnittene DNA mit Glasmilch aufgereinigt. Die Vektorenden wurden mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz aus 20ng dephosphoryliertem Vektor, einem 3- bis 5-fachem molarem Überschuss an Insert, 400 Units T4 DNA-Ligase und Reaktionspuffer wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

3.2.2.12.1 Ligation mit dem Zero Blunt[®] TOPO[®]-Cloning-Kit (Invitrogen)

PCR-Produkte, die mit Proofreading-Polymerasen (z.B. Pfu) amplifiziert wurden und über glatte Enden verfügen, können direkt in linearisierte Vektoren kloniert werden. Bei dem pCR[®]-BluntII-TOPO[®]-Vektor der Firma Invitrogen handelt es sich um einen linearisierten TA-Klonierungsvektor, an dessen 3'-Ende das Enzym Topoisomerase I gebunden ist.

In vivo ist Topoisomerase I für die Spaltung und Religation von DNA während der Replikation verantwortlich. Während der Spaltungsreaktion wird die Bindungsenergie durch Knüpfung des Enzyms an das 3'-Phosphat der doppelsträngigen DNA gespeichert⁶⁵. Topoisomerase I ist so in der Lage, durch kovalente Bindung jede DNA zu aktivieren, die eine 3'-CCCTT Erkennungssequenz enthält, und mit einem DNA-Fragment zu verknüpfen, das eine 5'-OH-Gruppe aufweist, z.B. einem PCR-Produkt⁶⁶.

PCR-Produkt, Salzlösung und Vektor wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Ligationsansatz:

- 4µl gereinigtes PCR-Produkt
- 1µl Salzlösung (1,2M NaCl, 60mM MgCl₂)
- 1µl pCR-BluntII-TOPO-Vektor

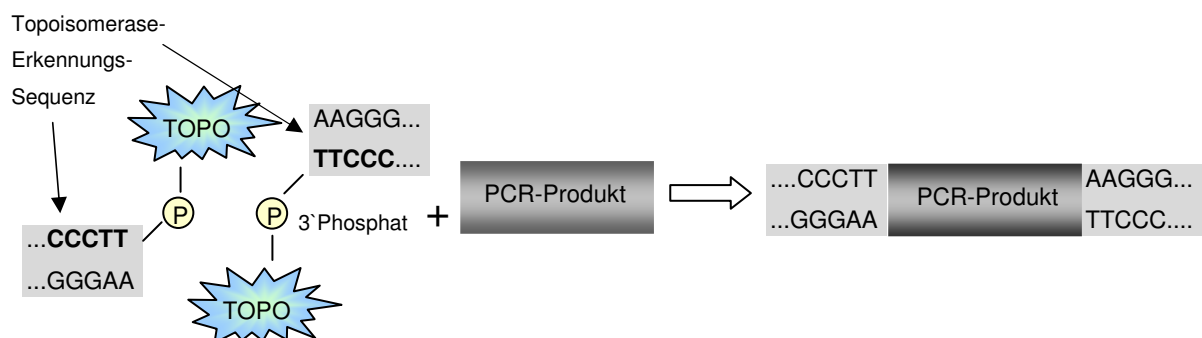


Abbildung 17 Schematische Darstellung der Zero-Blunt-TOPO-Klonierung von Blunt-end-DNA. *TOPO* Topoisomerase

3.2.2.12.2 Ligation mit dem TA-Cloning-Kit (Invitrogen)

PCR-Produkte, die mit Taq-Polymerase amplifiziert wurden, erhalten während der PCR-Reaktion am 3'-Ende unspezifische Überhänge eines Nukleotids, in der Regel von Adenin. Der linearisierte TA-Cloning-Vektor besitzt 3'-T-Überhänge, so dass das PCR-Produkt direkt in den TA-Klonierungsvektor ligiert werden kann.

Bei der Verwendung einer Proofreading-Polymerase mit 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität werden die Adenin-Überhänge hingegen durch die Exonuklease-Funktion wieder entfernt. Daher müssen in diesem Fall vor der eigentlichen Ligationsreaktion 3'-Adenin-Überhänge an die PCR-Amplifikate angefügt werden (*A-Tailing*). Hierfür wurde nach der PCR-

Reaktion mit Pfu-Polymerase 1µl Taq-Polymerase zum gesamten PCR-Ansatz pipettiert und für weitere 30 Minuten bei 70°C inkubiert. Die anschließende Ligationsreaktion erfolgte wie in Kap. 3.2.2.12 beschrieben.

3.2.2.13 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung von Fremd-DNA auf Bakterienzellen. Durch die Expression der aufgenommenen DNA erhalten die Transformanten neue Eigenschaften, so dass sie z.B. über die neu erworbene Antibiotikum-Resistenz selektiert werden können.

Kompetente *E. coli* Zellen (XL1-blue oder JM 109) wurden langsam auf Eis aufgetaut. 50µl Bakteriensuspension wurden mit 5µl Ligationsansatz oder 50ng Plasmid-DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die DNA wurde bei 42°C für genau 45 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt und direkt wieder zurück aufs Eis gestellt. Nach Zugabe von 900µl ΨB-Medium wurde die Suspension unter Schütteln 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden unterschiedliche Mengen des Ansatzes auf Selektions-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.2.14 Dauerkulturen von *E. coli* Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 500µl einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikum-Zusatz) mit 500µl steriler Glycerinlösung (65% Glycerin, 0,1M MgSO₄, 25mM Tris pH8) versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Kulturen wurden dann bei –80°C gelagert.

3.2.2.15 Plasmidgewinnung aus *E. coli* (Mini-/Midi-/Mega-/Gigapräparation)

Zur Amplifizierung von Plasmiden wurden erfolgreich transformierte *E. coli* vermehrt und anschließend die Plasmide mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit*[®] bzw. für größere Präparationen mit einem Midi, Mega oder Giga Kit der Firma QIAGEN (Hilden) isoliert. Zur Isolierung des Mineralocorticoid-Rezeptors mussten sehr große DNA-Mengen zur Transfektion eingesetzt werden. Die DNA wurde hierfür mit dem *QIAfilter Plasmid Mega/Giga Kit*[®] gewonnen, welches die Präparation von bis zu 2,5mg bzw. 10mg DNA ermöglicht.

Die zu selektierenden Bakterienkolonien wuchsen auf Nähragar unter Zusatz von Ampicillin (50µg/ml) oder Kanamycin (50µg/ml) über Nacht bei 37°C. Von den Agarplatten wurden Einzelkolonien gepickt und in 2ml Nährbouillon bei 37°C und 200U/min angezogen. Für eine Minipräparation wurden die Bakterien über Nacht inkubiert, für größere Präparationen wurde die Starterkultur tagsüber für acht Stunden geschüttelt. Damit wurden danach 50ml/500ml bzw. 2500ml Nährbouillon angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Minipräparation mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit*[®] (QIAGEN):

Die Bakterien wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 14.000rpm für 10 Minuten geerntet. Das Pellet wurde mit 250µl kaltem Puffer P1 (4°C) resuspendiert und nach Zugabe von 250µl Puffer P2 gut durchmischt. Die Zellen wurden durch diesen NaOH-SDS-Puffer P2 einer alkalischen Lyse unterzogen. Puffer 2 wurde nach maximal 5 Minuten durch Zugabe von 350µl Puffer N3 neutralisiert. Durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000rpm wurden Zelltrümmer sedimentiert. Der geklärte Überstand wurde auf ein QIAprep Spin Column[®] pipettiert. Durch erneute Zentrifugation für 60 Sekunden bei 13.000rpm wurde die DNA an die Säulenmatrix gebunden. Es folgte ein Waschschrift mit 750µl Puffer PE sowie ein weiterer Zentrifugationsschritt, um restliches Ethanol vollständig zu entfernen. Daraufhin wurde die DNA mit 50µl Wasser (pH8) oder mit EB-Puffer (10mM Tris, pH8,5) eluiert .

Midipräparation mit dem *HiSpeed Plasmid Midi Kit*[®] (QIAGEN):

Die Bakterien wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 4.300rpm für 30 Minuten geerntet. Das so gewonnene Pellet wurde mit 6ml Puffer P1 (4°C) resuspendiert und nach anschließender Zugabe von 6ml Puffer P2 durchmischt. Nach nicht mehr als 5 Minuten wurde das Lysat durch Zugabe von 6ml Puffer P3 (3M Kaliumacetat, 4°C) und sofortiges Mischen neutralisiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation im QIAfilter Cartridge[®], um eine vollständige Fällung von genomischer DNA, Proteinen, Zelltrümmern und SDS zu erreichen. Diese unerwünschten Bestandteile wurden durch Filtern des Lysats durch das QIAfilter Cartridge[®] abgetrennt. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde auf ein zuvor mit Puffer QBT äquilibriertes HiSpeed Tip[®] gegeben, so dass die DNA an die Säulenmembran binden konnte. Es folgte ein Reinigungsschritt mit 20ml Puffer QC, der auf die Säule gegeben wurde und durch die Gravitation die Säule durchfloss. Die DNA wurde schließlich mit 5ml Puffer QF eluiert und nach Zugabe von 3,5ml Isopropanol gefällt. Die Lösung wurde durch das QIAprecipitator Module[®] filtriert, wobei die DNA gebunden wurde, die Isopropanol-Mischung aber durchfloss. Nach einem weiteren Waschschrift mit 75% EtOH wurde die DNA mit 500µl EB-Puffer (10mMTris, pH8,5) eluiert.

Mega- und Gigapräparation mit dem *QIAfilter Plasmid Mega/Giga Kit*[®] (QIAGEN):

Nach dem Ernten der Bakterien durch eine Zentrifugation von 30 Minuten bei 4.300rpm wurde das Pellet in einer 500ml-Flasche mit insgesamt 50ml/125ml Puffer P1 resuspendiert. Die Bakterienzellwände wurden durch Zugabe von 50ml/125ml Puffer P2 (5Min, RT) lysiert; danach wurde die Lösung durch 50ml/125ml Puffer P3 (4°C) neutralisiert, in ein QIAfilter Mega/Giga Cartridge[®] eingefüllt und 10 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Durch Anlegen von Vakuum wurde das Lysat abgesaugt. Danach wurde das QIAfilter Cartridge[®] mit 50ml Puffer FWB2 gewaschen. Inzwischen wurde ein QIAGEN-tip2500[®] mit 35ml/75ml Puffer QBT äquilibriert. Das Lysat wurde auf die äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde mit 200ml/600ml Puffer QC gewaschen und die DNA im Anschluss mit 35ml/100ml Puffer QF eluiert. Durch Zugabe von 24,5ml/70ml Isopropanol (RT) und Zentrifugation (90 Min, 4.300g, 4°C) wurde die DNA gefällt. Das Pellet wurde mit 7ml/10ml EtOH 70% gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (90 Min, 4.300g, 4°C) etwa 15 Minuten an der Luft getrocknet und in 5ml/20ml EB-Puffer aufgenommen.

3.2.2.16 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die einfachste Methode zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen ist die photometrische Messung der UV-Absorption bei 260nm. Um die Reinheit der Probe abzuschätzen, wurde außerdem die OD bei 280nm gemessen. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte über 1,5 liegen.

3.2.2.17 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

Um die DNA zu konzentrieren und niedermolekulare Bestandteile zu entfernen, wurde zuvor eine Ethanol-fällung durchgeführt. Hierbei wird der Nukleinsäure durch Salz- und Alkoholzugabe Wasser entzogen. Die Nukleinsäuren denaturieren und bilden ein Präzipitat, welches abzentrifugiert und anschließend in einem geeigneten Puffer wieder aufgenommen werden kann.

2µg DNA wurden mit dem gleichem Volumen 3M Natriumacetatlösung (pH 5,2) versetzt und mit dem 2,5-fachen Volumen absolutem Ethanol gefällt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei -80°C und einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 4°C und 12.000g konnte die DNA als Pellet gewonnen werden. Der ethanolische Überstand wurde verworfen und die DNA mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Um den restlichen Alkohol zu entfernen, wurde die DNA im Vakuum (Speed Vac) getrocknet.

3.2.3 Protein-Techniken

3.2.3.1 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der Bio-Rad DC-Protein Assay nach Lowry verwendet. Proteine bilden in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} -Ionen einen Kupfer-Protein-Komplex und reduzieren diese zu Cu^+ -Ionen (Biuret-Reaktion). Der so entstandene Cu^+ -Protein-Komplex reduziert seinerseits das Folin-Reagenz, was durch einen Farbumschlag von gelb nach blau sichtbar wird.

Bio-Rad DC-Reagenzien:

Reagenz A: alkalische Kupfertartrat-Lösung

Reagenz B: verdünntes Folin-Reagenz (Phosphormolybdat- und Phosphorwolframat-Lösung)

Reagenz S: Natriumdodecylsulfat-Lösung

Reagenz A': 1ml Reagenz A + 20 μ l Reagenz S

Die Bestimmung wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Alle Proben wurden jeweils als Dreifachwert bestimmt. Für die Kalibriergerade wurde eine Verdünnungsreihe von BSA in Wasser in den Konzentrationen 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 μ g/ml hergestellt. Zu 5 μ l Probe oder Standard wurden 25 μ l Reagenz A' und 200 μ l Reagenz B pipettiert. Der Ansatz wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin die Extinktion im Photometer bei 750nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Standardkurve mit BSA.

3.2.3.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei diesem Verfahren werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Natriumdodecylsulfat (SDS), ein anionisches Detergens, bindet an die kationischen Reste der Proteine mit einem konstanten Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4g SDS/g Protein in 1% SDS-Lösungen) und denaturiert sie. Dabei entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe. Diese negative Überschussladung verhält sich proportional zur Größe des Proteins, die eigene Ladung des jeweiligen Proteins wird vernachlässigbar. Die Proteine wandern daher im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten ausschließlich von ihrer Größe abhängt.

Zur optimalen Auftrennung des MR wurden Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 7,5 oder 10% gewählt. Tris, Acrylamid, Wasser und SDS wurden gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS eingeleitet (Mengen siehe Tabelle). Die Vertikalkammer wurde zuerst bis zu 2/3 mit dem Trenngel befüllt. Um eine glatte

Trennfläche zu erhalten, wurde mit Wasser überschichtet. Nach einer halben Stunde wurde das Wasser vom polymerisierten Gel entfernt. In das verbleibende Volumen der Kammer wurde das Sammelgel gegossen und ein 10-Well-Kamm eingesetzt.

Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2x-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x-Elektrophoresepuffer mit einer Stromstärke von 25mA pro Gel durchgeführt.

	<i>Trenngel 7,5%</i>	<i>Trenngel 10%</i>	<i>Sammelgel</i>
Acrylamid	3ml	4ml	1ml
Tris-HCl pH 8,8	3ml	3ml	-
Tris-HCl pH 6,8	-	-	1,25ml
SDS (10%)	120µl	120µl	50µl
APS (10%)	100µl	100µl	20µl
TEMED	10µl	10µl	20µl
Wasser	6ml	5ml	2,5ml

Tabelle 9 Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen (Ansatz für 2 Gele)

3.2.3.3 *Western-Blot*

Beim Western Blot werden die im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen. Hierfür wurden Nitrocellulose-Membranen verwendet. Nitrocellulose bindet Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Für den Proteintransfer wurden SDS-Gel und Membran luftblasenfrei aufeinander gelegt. Das Ganze wurde von beiden Seiten mit je zwei Lagen Filterpapier und einem Schwamm bedeckt und in eine Bio-Rad-Blotkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer bei 120mA für 2 Stunden.

Nach dem Transfer wurden die Proteine auf dem Blot mit Ponceaurot angefärbt. Hierfür wurde der Blot für 5 Minuten in Ponceaurot-Lösung (0,2% in 3% Trichloressigsäure) bei Raumtemperatur inkubiert und mit Wasser gewaschen.

3.2.3.3.1 *Nachweis von Proteinen in der Western-Blot-Analyse*

Zur Blockierung von freien Bindungsstellen wurde die Blotmembran in 5% Trockenmilch in TBS-T oder im Falle einer anschließenden Inkubation mit Streptavidin-Konjugat in 3% BSA in TBS-T 60 Minuten unter Schütteln inkubiert.

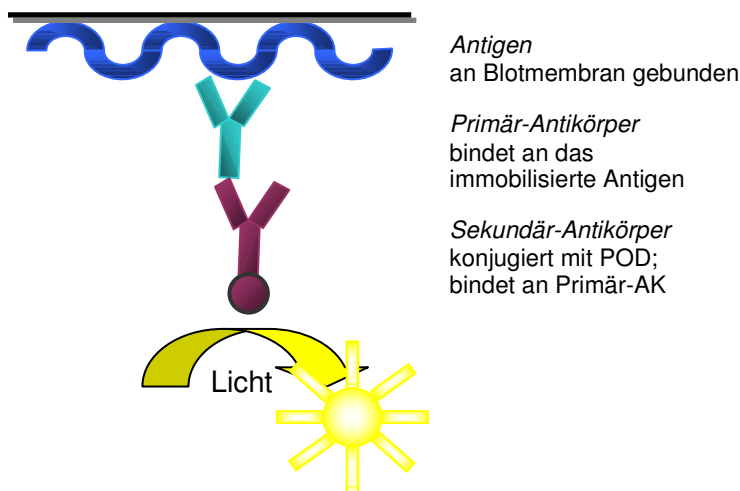


Abbildung 18 Detektion von Proteinen auf Blotmembranen

Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde der Blot über Nacht bei 4°C mit dem Erst-Antikörper inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Blot nach weiteren Waschschritten eine Stunde mit einem Sekundär-Antikörper inkubiert, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert war, welche das HRP-Substrat in Lichtemission umwandelt.

Nach erneutem Waschen wurde hierfür die Membran entweder zwei Minuten mit ECL[®]-Reagenz oder fünf Minuten mit LumiLight[®] inkubiert und zwischen zwei Folien gelegt. Die Peroxidase-markierten Antikörper katalysieren die Oxidation des Luminols im HRP-Reagenz und lösen so eine Chemilumineszenz aus. Das entstehende Licht kann dann im Falle des ECL[®]-Reagenz über einen Film bzw. bei Verwendung von LumiLight[®] über einen Film oder mit dem Chemi-Imager gemessen werden.

3.2.3.3.2 Stripping von Western-Blot-Membranen

Das Strippen von Western-Blot-Membranen dient dazu, bereits gebundene Antikörper zu entfernen und ermöglicht so die Detektion mit einem anderen Primärantikörper. Zur Entfernung von gebundenen Antikörpern wurde der Blot zweimal jeweils für 20 Minuten in 0,1M Glycin-Lösung (pH2,9) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen konnte der Blot geblockt und eine erneute Immunodetektion durchgeführt werden.

3.2.3.4 Anfärben von Proteinen

In SDS-Acrylamid-Gelen aufgetrennte Proteine wurden entweder über Coomassie- oder durch Silberfärbung nachgewiesen. Die Silberfärbung stellt eine sehr empfindliche Methode zur Detektion von Proteinen dar. Die Sensitivität liegt im Vergleich zur Coomassie-Färbung ungefähr um den Faktor 100 höher.

3.2.3.4.1 Coomassie-Färbung

In der Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine wurden nach einer 15-minütigen Fixierung (10% Essigsäure, 40% Ethanol, 50% Wasser) 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung inkubiert (0,1% Coomassie R-250 in Fixierlösung). Anschließend wurden die Gele in Fixier-Lösung entfärbt.

3.2.3.4.2 Silberfärbung

Zur Silberfärbung wurden die Gele zunächst 2x30 Minuten fixiert und anschließend 3x20 Minuten mit 50% Ethanol-Lösung gewaschen. Nach einer 1-minütigen Inkubation in Natriumthiosulfat-Lösung wurden die Gele zum Waschen 3x20 Sekunden in Wasser geschwenkt und anschließend 20 Minuten in Imprägnier-Lösung inkubiert. Nach erneutem Waschen (2x20 Sekunden) wurde so lange Entwickler-Lösung auf das Gel gegeben, bis deutlich Proteinbanden zu erkennen waren. Die Entwickler-Lösung wurde sofort abgegossen und die Reaktion eine Minute mit 10% Essigsäure und 10 Minuten mit Destainlösung gestoppt. Das Gel wurde anschließend gut gewässert. Nun konnten entweder Banden ausgeschnitten oder das Gel getrocknet werden.

Fixier-/Destainlösung:

10% Essigsäure
40% Ethanol
50% Wasser

Imprägnier-Lösung:

0,2g AgNO_3
75 μl Formaldehyd-Lösung
ad 100ml H_2O

Entwickler-Lösung:

6g Na_2CO_3
2ml Natriumthiosulfat-Lösung
50 μl Formaldehyd-Lösung
ad 100ml H_2O

Natriumthiosulfat-Lösung:

0,02g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Ad 100ml H_2O

3.2.3.5 Konzentrierung von Proteinen

Die Aufkonzentrierung von Proteinen erfolgte mittels einer Centricon10-Zentrifugationseinheit (Amicon). Die Probe wurde hierfür auf eine Ultra-Filtrationseinheit gegeben, die sich auf einem 2ml- Reaktionsgefäß befand (s. Abbildung 19).

Am unteren Ende dieser Einheit befand sich eine Membran, die das Lösungsmittel sowie Proteine <10kDa passieren lässt; dieses Filtrat wird im Filtratgefäß aufgefangen und verworfen. Größere Proteine hingegen werden zurückgehalten, wodurch die Probe

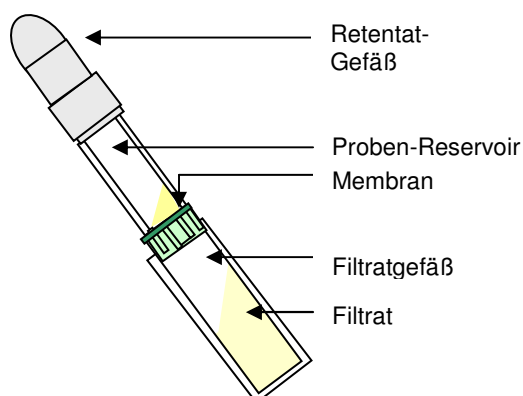


Abbildung 19 Centricon-Konzentrator

konzentriert wird. Nach einer Zentrifugation von ca. 90 Minuten bei 4°C und 5000g blieb ein Restvolumen von ~70 μl im Probengefäß zurück. Die Filtrationseinheit wurde entfernt und ein Retentat-Gefäß auf das Probenreservoir aufgesetzt. Die konzentrierte Probe wurde schließlich durch Zentrifugation der umgedrehten Einheit für 2 Minuten bei 1000g im Retentat-Gefäß aufgefangen.

3.2.3.6 Immunpräzipitation

3.2.3.6.1 Immunpräzipitation Flag-MR und EGFP-MR

Die Immunpräzipitation des FLAG-Fusionsproteins erfolgte mit dem Anti-Flag[®] M2-Affinity Gel (Sigma), die des GFP-Fusionskonstruktes mit Anti-GFP (Roche). Die MR-Fusionskonstrukte wurden mit FuGene 6 in HEK293T Zellen transfiziert (siehe 3.2.1.4) und 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Ernte wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, anschließend in PBS-Puffer abgeschabt und 5 Minuten bei 800g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in Triton X-100 Lysis-Puffer lysiert. Zelltrümmer wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 12.000g und 4°C entfernt.

40µl Anti-Flag[®] M2-Affinity Gel (ca. 20µl Bettvolumen) wurden 30 Sekunden bei 8.000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads dreimal mit jeweils 500µl TBS-Puffer (4°C) gewaschen. Danach wurde das geklärte Zelllysats zum gewaschenen Gel gegeben und zwei Stunden oder über Nacht bei 4°C rotiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Affinitäts-Gel durch Zentrifugieren (30s, 8.000g, 4°C) vom Überstand abgetrennt. Nach dreimaligem Waschen des Gels mit jeweils 500µl TBS (4°C) wurden die gebundenen Proteine durch eine 5-minütige Inkubation mit 100µl 0,1M Glycin (pH3,5) und eine abschließende Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß mit 10µl 0,5M Tris-HCl pH7,4 / 1,5M NaCl gegeben.

Für eine Immunpräzipitation von EGFP-hMR erfolgte zuerst ein Klärungs-Schritt des Gesamt-Zelllysats für 3 Stunden bei 4°C mit 50µl Protein-G-Agarose-Suspension. Nach einem Zentrifugationsschritt (20s, 12.000g, 4°C) wurde der Überstand eine Stunde mit 3µg anti-GFP-Antikörper inkubiert. Daraufhin wurden erneut 50µl Protein-G-Agarose hinzu pipettiert und die Inkubation über Nacht bei 4 °C fortgesetzt. Durch eine anschließende Zentrifugation (20s, 12.000g, 4°C) sedimentierte die Protein-G-Agarose zusammen mit den an anti-GFP gebundenen Proteinen. Die Agarose wurde drei Waschschritten unterzogen, bevor sie in 1x-Probenpuffer aufgenommen wurde.

Die Proben wurden schließlich mittels SDS-PAGE, Western Blot und nachfolgende Immundetektion analysiert.

3.2.3.6.2 Immunpräzipitation Strep-Tag MR - One-Strep-Kit[®] (IBABioTAGnology)

Der Mineralocorticoid-Rezeptor wurde zum einen N-terminal, zum anderen C-terminal mit einem Streptavidin-Tag versehen. HEK293T-Zellen wurden mit dem MR-Fusionskonstrukt transfiziert und nach einer Expressionsdauer von 72 Stunden lysiert. Strep-Tag-Fusionsproteine wurden dann über StrepTactin-Affinitätssäulen gereinigt. Hierbei wurde der MR zusammen mit seinen interagierenden Proteinen isoliert.

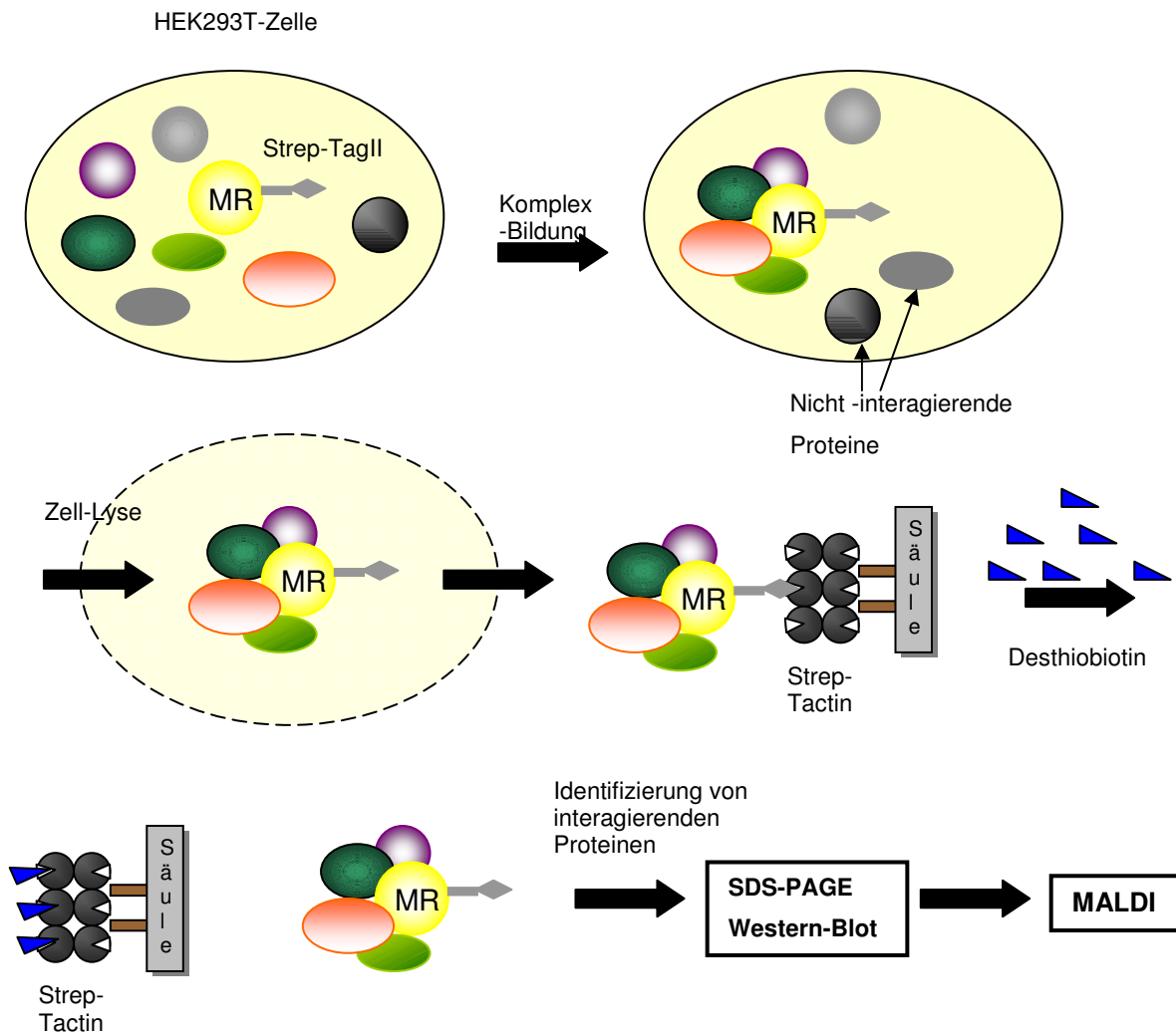


Abbildung 20 Prinzip und Funktion des One-Strep®-Kit

Die Proteine wurden mit 2,5 mM Desthiobiotin eluiert, um danach die Säule mit einem Azofarbstoff zu regenerieren. Bei diesem Vorgang schlägt die Farbe der Säule von gelb nach orange um. Zum Eluieren kann ebenfalls Biotin verwendet werden. Allerdings kann die Säule dann nicht mehr regeneriert werden.

Die Proteine wurden nach der Elution über eindimensionale SDS-Gele aufgetrennt und danach über massenspektrometrische Analyse (s. Kap. 3.2.4.6) identifiziert. HEK293T-Zellen wurden pro Versuchsansatz auf jeweils zwanzig 15cm-Zellkulturschalen ausgesät und am darauf folgenden Tag entweder mit dem Kontrollplasmid pEXPR-IBA-PR65 oder mit pEXPR-IBA-hMR mittels der Calcium-Phosphat Methode transfiziert (s. Kap. 3.2.1.4.2). Zusätzlich wurde eine Kontrolle mitgeführt, bei der der leere Expressionsvektor in die Zellen eingebracht wurde. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel: die Zellen wurden einmal mit Medium, dann mit PBS gewaschen und schließlich mit frischem Medium inklusive 5% Steroidhormon-freiem FKS überschichtet. Die Ernte der Zellen erfolgte schließlich 72 Stunden nach der Transfektion. Hierfür wurden sie mit PBS gewaschen, in serumfreiem Medium abgeschabt und 10 Minuten bei

Raumtemperatur und 1000g zentrifugiert. Anschließend konnten die Zellen stimuliert werden. Das Zellpellet von 20 Schalen wurde wiederum in 40ml serumfreiem DMEM-Medium aufgenommen und der jeweilige Stimulus für 5 Minuten bzw. 2 Stunden zugegeben. Während der gesamten Inkubationsdauer wurden die Zellen bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 1000g und 4°C wurden die Zellpellets 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend lysiert. 10^9 Zellen wurden für 20 Minuten in insgesamt 10ml Triton[®]X100-Lysispuffer lysiert und zehnmal zum Homogenisieren gedounced.

Zelltrümmer wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 750g und 4°C abgetrennt. Da unlösliche Proteine die Strep-Tactin[®]-Säule verstopfen können, wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt von einer Stunde bei 100.000g und 4°C durchgeführt, um ein Lysat zu erhalten, welches die gewünschten Proteine enthält.

Bevor das Zelllysate auf die Strep-Tactin[®]-Sephrose-Säule gegeben werden konnte, musste diese zuerst mit Waschpuffer äquilibriert werden. Für kleinere Volumina, z.B. für die Positivkontrolle, wurde eine Säule mit 200µl, für größere Volumina eine Säule mit 1ml Säulenvolumen verwendet. Nachdem das Zelllysate die Säule durchflossen hatte, wurde diese fünfmal mit 200µl/1ml Puffer W gewaschen und die einzelnen Fraktionen in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt. Die an das Säulenmaterial gebundenen Proteine wurden nun sechsmal mit jeweils 100µl/500µl Puffer E eluiert und die einzelnen Eluate in einem Eppendorf-Tube aufgefangen.

Die Säule wurde nach der Elution der Proteine dreimal mit 1ml/5ml Puffer R regeneriert. Die im Regenerierungspuffer enthaltene Hydroxy-azophenyl-benzoessäure ist in Lösung gelb, an die Säulenmatrix gebunden rot. Danach wurde zweimal mit je 800µl/4ml Puffer W gewaschen, wobei sich das Säulenmaterial wieder entfärbte. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Strep-Tactin[®]-Säule, überschichtet mit 2ml Puffer W, bei 4°C gelagert.

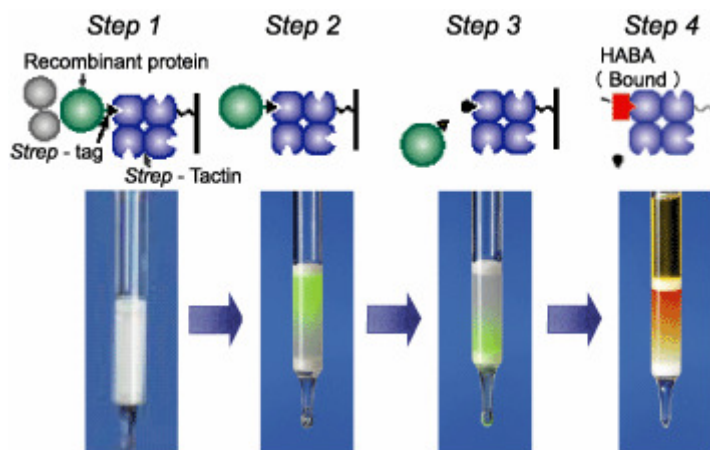


Abbildung 21 Recycling der Strep-Tactin[®]-Säulen (www.iba-go.com)

Von jeder der gesammelten Fraktionen wurden 20µl auf ein SDS-Gel (7,5 oder 10% zur Detektion des MR, 12,5% zur Detektion von PR65/PP2Ac) aufgetragen und die aufgetrennten Proteine im Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Isolierte Proteine konnten durch Inkubation mit Strep-Tactin-Konjugat (1:4000; 60 Minuten) detektiert werden.

Das 65kDa große Kontrollprotein PR65 bildet einen Komplex mit dem 33kDa großen Protein PP2Ac, welches im Blot durch Inkubation mit Goat-PP2Ac-polyklonalem Antikörper (1:1000; 60 Minuten) und HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (Rabbit-anti-goat HRP, 1:2000, 60Minuten) detektiert werden konnte.

Alle Fraktionen, in denen der Mineralocorticoid-Rezeptor eluiert wurde, wurden vereint und über eine Centricon-Mikrokonzentrationseinheit (Fa. Amicon) auf ca. 70µl Volumen eingeeengt (s. Kap. 3.2.3.5). 20µl der konzentrierten Proteinlösung wurden über ein eindimensionales SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (s. Kap. 3.2.3.4.1).

3.2.4 Spezielle Methoden

3.2.4.1 Ussing-Kammer-Methode

3.2.4.1.1 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

Durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes mit einem Epithel-Voltohmmeter (EVOM) kann das Wachstum von Epithelzellen einfach überprüft werden, ohne die Zellen dabei in Mitleidenschaft zu ziehen. Die Messung erfolgte über zwei sogenannte STX2 Chopstick-Elektroden gemäß der Anleitung des Herstellers. Die beiden Elektroden weisen unterschiedliche Längen auf. Die externe Elektrode ist etwas länger, so dass diese den Boden des Wells erreicht, die interne hingegen kürzer, um während der Messung nicht die Zellen auf dem permeablen Support zu berühren. Zur Bestimmung des Widerstandes wurde zuerst immer der Leerwert für ein Insert ermittelt (Widerstand der Membran in Puffer ohne Zellen).

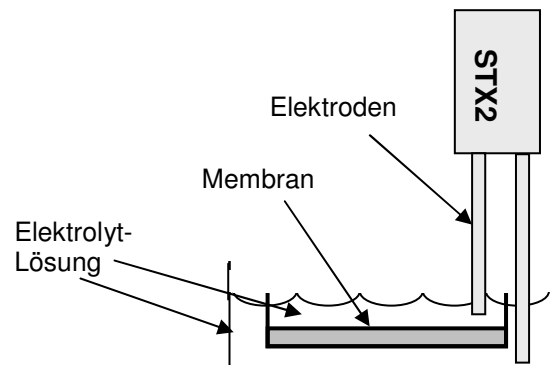


Abbildung 22 Bestimmung des transepithelialen Widerstands mit dem EVOM

3.2.4.1.2 Versuchsanordnung

Alle Versuche wurden mit Hilfe einer modifizierten Ussing-Kammer durchgeführt, die von Dr. H. Mairbäurl (Medizinische Klinik, Innere Medizin VII, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde.

Eine Kammer bestand aus zwei miteinander verschraubbaren Halbkammern aus Plexiglas. Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Filtern mit 0,4µm Porendurchmesser (Transwells, Costar) kultiviert. Die Zellen wuchsen auf diesen permeablen Supports zu Monolayern heran. Nach Erreichen der Konfluenz wurden diese Transwells in einer Plexiglasplatte befestigt, die dann zwischen den beiden Halbkammern fixiert wurde, so dass der konfluente Monolayer apikales und basolaterales Kompartiment voneinander abtrennte. Die apikale und die basolaterale Seite der Filtermembran wurden mit Elektrolytlösung befüllt. Durch zirkulierendes Wasser in einem Mantelsystem wurde die Kammer mittels eines externen Wasserbades auf 37°C temperiert.

Auf der Oberseite beider Halbkammern befand sich eine kleine Öffnung, über die sowohl die Nährlösungen als auch Stimuli in die Kammerflüssigkeit eingebracht werden konnten.

Die Messung der Potentialdifferenz zwischen den beiden Kammerhälften und die Applizierung von Kurzschlussstrom erfolgten über Silber-Silberchlorid-Elektroden, welche über leitfähige Agarbrücken und 3M Kaliumchlorid-Lösung mit den Elektrolytlösungen in den Kammern in Verbindung standen. Die Agarbrücken dienten dem Schutz der Zellen vor der konzentrierten KCl-Lösung, in die die Elektroden eintauchten.

3.2.4.1.3 Elektrolytlösungen

Messungen in der Ussing-Kammer wurden in 37°C warmem Kulturmedium (DMEM) durchgeführt.

3.2.4.1.4 Elektrische Messungen

Messungen in der Ussing-Kammer können entweder im offenen „open circuit“, im „short circuit“ oder im „voltage-clamp“ Modus durchgeführt werden (s. Abbildung 23). Im open-circuit Modus wird die Potentialdifferenz (PD) nicht beeinflusst und direkt gemessen, während unter voltage-clamp Bedingungen (Spannungsklemme) ein Strom eingespeist wird und so die Potentialdifferenz auf bestimmte Werte eingestellt wird. Die short-circuit Methode (Kurzschluss) stellt eine Sonderform der Spannungsklemme dar. Durch das Einspeisen von Strom, dem sogenannten Kurzschlussstrom I_{sc} , wird die Potentialdifferenz auf Null abgeglichen.

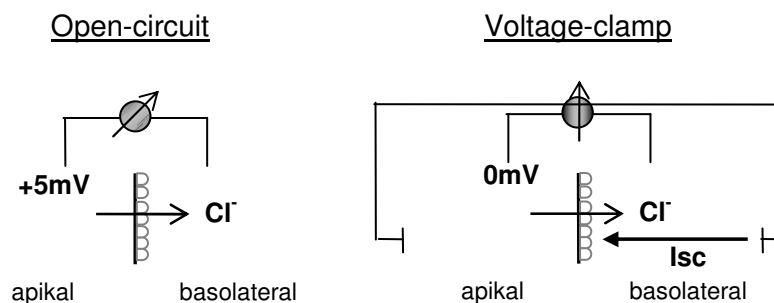


Abbildung 23 Messung des Kurzschlussstroms I_{sc} in der Ussing-Kammer mit der open-circuit und der voltage-clamp Methode

Die konfluenten Monolayer wurden während einer etwa 10 minütigen Equilibrierungsphase zunächst unter open-circuit Bedingungen belassen. Danach wurde die Spannung auf 0mV gehalten (short-circuit) und kontinuierlich der Kompensationsstrom I_{sc} gemessen. Die Daten wurden aufgezeichnet.

3.2.4.2 Untersuchung G-Protein gekoppelter Signalwege

Vorbereitung der Proben:

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden distale tubuläre Epithelzellen (DTEC) bis zur Konfluenz in 24-Well-Platten kultiviert. 24 Stunden vor dem Versuch wurde das Medium entfernt und durch Medium ohne Zusatz von Serum ersetzt. Zunächst erfolgte eine Vorinkubation der Zellen über eine Dauer von fünf Stunden entweder mit 100nM Aldosteron oder, als Negativkontrolle, nur mit Ethanol (0,001%). Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 Minuten in PSS-Puffer mit Zusatz des unspezifischen Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) vorinkubiert und für weitere 5 Minuten mit den in Tabelle 10 angegebenen Substanzen in der jeweiligen Konzentration oder mit Ethanol stimuliert. Die Reaktion wurde durch Kühlen der Zellen auf Eis und Absaugen des Stimulus abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml EtOH 65% pro Well geerntet und in Eppendorfgefäße überführt. Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 10.000U/min und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und in der Speed Vac getrocknet. Das Pellet wurde schließlich in 200µl RIA-Assay-Puffer resuspendiert und die Proben bei -20°C gelagert.

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Funktion</i>
Dopamin	10^{-8}M , 10^{-7}M , 10^{-6}M	D ₁ (Niere), D ₅ - Rezeptor: AC↑ D ₂ , D ₃ , D ₄ Rez.: AC↓
Parathormon (PTH)	10^{-10}M , 10^{-8}M 10^{-6}M	AC↑
Vasopressin	10^{-8}M , 10^{-6}M	V ₂ -Rez. in der Niere: AC↑
Isoprenalin	10^{-8}M , 10^{-6}M	AC↑
Calcitonin	10^{-8}M , 10^{-6}M	AC↑

Tabelle 10 Im cAMP-Assay verwendete Stimulantien. AC Adenylylcyase

Radioimmunassay

Die cAMP-Konzentration wurde mittels eines kommerziellen Kits (cAMP [¹²⁵I] Biotrak Assay System) der Firma Amersham Biosciences bestimmt.

Prinzip:

Das hier verwendete RIA-Assay Kit basiert darauf, dass das in der Probe vorhandene cAMP mit dem zugesetztem [¹²⁵I]-markiertem cAMP um die Bindung an einen spezifischen Antikörper konkurriert, der im Überschuss zur Probe zugegeben wird.

Verwendete Puffer:

- Assay-Puffer: 0,05M Acetat pH5,8, 0,01% Azid.
10ml der konzentrierten Pufferlösung wurden in einen Messzylinder überführt und mit destilliertem Wasser auf 500ml, auf die oben angegebenen Konzentrationen, aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.
- Tracer: Adenosin 3', 5'-zykl. Phosphorsäure-2'-O-succinyl-3-[¹²⁵I]iodotyrosin-methylester, lyophilisiert, ~59kBq, 1,6µCi.
Der Tracer wurde in 11ml Assay-Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert.
- Antiserum: Rabbit-anti-succinyl cAMP; lyophilisiert; 0,5% BSA. Das Antiserum wurde in 11ml Assay-Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert.
- Standard: cAMP-Standard, lyophilisiert, 64pmol. Der vom Hersteller mitgelieferte lyophilisierte cAMP-Standard wurde in 2ml Assay-Puffer rekonstituiert. Die Konzentration dieser Stammlösung betrug 32pmol cAMP/ml.
- Zweitantikörper: Amerlex-M-Reagenz. Donkey anti-rabbit Serum; gebunden an magnetisierbare Polymerpartikel; Zusatz von Natriumazid.

Standardreihe:

0fmol (B₀) / 25fmol / 50fmol / 100fmol / 200fmol / 400fmol / 800fmol / 1600fmol / TC (total counts)

500µl nicht-acetylierter Standard (32pmol/ml) wurden mit 500µl Assay-Puffer verdünnt (1600fmol) und anschließend sechsmal 1:2 mit Assay-Puffer weiter verdünnt.

Durchführung:

Zu 50µl Standard bzw. 50µl Probe wurden 50µl Antiserum (außer TC-Tube) pipettiert und nach Mischen (Vortex) eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Danach wurden 50µl [¹²⁵I]cAMP-Tracer hinzu gegeben und für weitere 3 Stunden bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 250µl Amerlex-M-Zweitantikörper hinzupipettiert (außer TC-Tube). Der Antikörper-Komplex wurde nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur durch Magnetseparation abgetrennt. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Radioaktivität im γ-Counter für 60s/Probe gemessen.

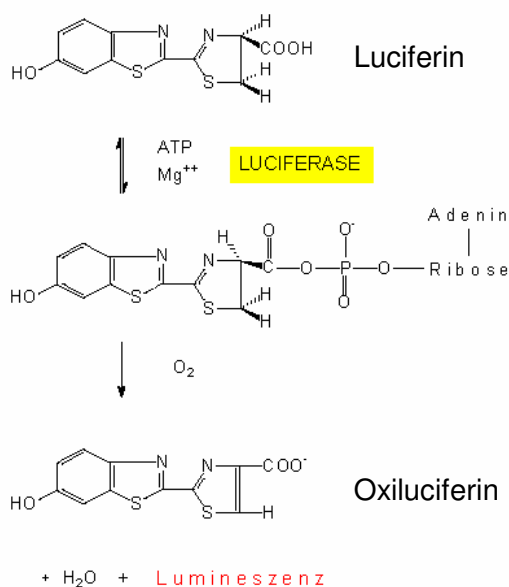
3.2.4.3 [^3H]-Thymidin/Leucin-Assay

Die mögliche Wirkung der ausgewählten Gene (siehe Kapitel 2.2.1) auf Zellproliferation und Proteinsyntheserate wurde durch den Einbau von Methyl- ^3H -Thymidin (Proliferation) bzw. ^3H -Leucin (Proteinsynthese) bestimmt.

Die stabil-transfizierten M1-Zellen wurden auf 24-Well-Platten ausgesät. Nach drei Tagen waren die Zellen zu ca. 80% konfluent und wurden für weitere 12 Stunden unter Serumentzug bei 37°C inkubiert.

Um die Proteinmengen anzugleichen, wurde parallel eine Proteinbestimmung durchgeführt. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C mit 0,3 μCi (11,1kBq pro Ansatz) Methyl- ^3H -Thymidin oder ^3H -Leucin in 10 μl PBS pro Well wurden die Zellen auf Eis mit 1ml PBS (4°C) gewaschen. DNA und Proteine wurden durch Zugabe von 1ml 5% TCA-Lösung ausgefällt. Nicht eingebautes Methyl- ^3H -Thymidin bzw. ^3H -Leucin verblieb dabei im Überstand und konnte nach einer 30-minütigen Inkubation abgesaugt und mit PBS (4°C) gewaschen werden. Die präzipitierten Makromoleküle wurden mit 0,5ml NaOH/SDS-Lösung (0,5%NaOH, 0,5% SDS) resolubilisiert. Das Lysat wurde in Szintillationsgefäße gegeben und mit 3ml Szintillations-Cocktail gemischt. Alle Werte wurden als 8-fach-Werte bestimmt.

3.2.4.4 Transaktivierungsversuche – MMTV-Luc-Reportergen-Assay



Beim MMTV-Luc-Reportergen-Assay dient die aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* stammende Luciferase als Reportergen. Durch das Genprodukt wird das Substrat Luciferin in Anwesenheit von Luftsauerstoff, ATP und Mg²⁺-Ionen zu Oxiluciferin dehydriert. Die Energie wird als Licht emittiert (siehe Abbildung 24).

Abbildung 24 Chemilumineszenz-Reaktion beim Luciferase-Assay; www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e44/44f.htm

Das Reportergen Luciferase befindet sich auf dem Vektor pGL3-MMTV-Luc, welcher zusammen mit dem zu untersuchenden MR-Fusionsplasmid in die Zellen eingebracht wird. Nach Aktivierung des MR wird ebenfalls die Aktivierung des Luciferase-Reportergens initiiert. Die Menge der exprimierten Luciferase kann über die Messung der frei werdenden Lichtmenge bei 562nm ermittelt werden.

HEK293T-Zellen wurden für diesen Versuch so auf 12-Well Platten ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 50-60% erreicht hatten. Dem Kulturmedium wurde 10% Kohle-behandeltes (steroidfreies) Serum zugesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Luciferase-Reporter-Konstrukte über Transfektion mit FuGene 6 in die Zellen eingebracht. Je 12-Well wurden 1µg Reporterplasmid und 1µg des Expressionsplasmids sowie eines weiteren, Galaktosidase konstitutiv exprimierenden Plasmids, als interner Standard (s.u.) in die Zellen transfiziert und anschließend für weitere 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Das Komplettmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit serumfreiem Medium überschichtet. Daraufhin wurden die Zellen entweder mit verschiedenen Stimuli (aus ethanolischen Lösungen verdünnt) oder als Negativkontrolle nur mit Ethanol stimuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für den eigentlichen Assay wurden die Zellen im Anschluss an die Inkubation lysiert und die Menge der gebildeten Luciferasen luminometrisch bestimmt. Hierfür wurden die Zellen nach zwei Waschschritten mit PBS 5 Minuten mit 200µl Lysis-Puffer (Glo-Lysis-Buffer®, Promega) einer Lyse unterzogen und in Eppendorf-Gefäße pipettiert. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Lysate 5 Minuten bei 4°C und 14.000g zentrifugiert und die Überstände in neue Tubes überführt. 40µl des gereinigten Lysats wurden in einer 96-Well-Platte mit 40µl Luciferase-Reagenz (Steady-Glo®, Promega) versetzt und die entstehende Intensität der Lichtsignale sofort im Luminometer gemessen.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde der pSV-β-Galaktosidase-Vektor als Positivkontrolle eingesetzt. Der SV40-Promotor fördert die Transkription des lacZ Gens, welches in das β-Galaktosidase-Enzym translatiert wird. Das β-Galaktosidase-Plasmid wird bei einer Ko-Transfektion proportional zum Luciferase-Vektor in die Zellen aufgenommen und dient daher als interne Kontrolle. Die β-Galaktosidase hydrolysiert das farblose Substrat ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid) zum gelben o-Nitrophenol, dessen Intensität bei 420nm (Optimum) in einem Photometer gemessen werden kann.

Um die Aktivität dieses Enzyms zu bestimmen, wurden 40µl des Lysats zusammen mit 40µl Galaktosidase-Substrat (200mM Natriumphosphat-Puffer, 2mM MgCl₂, 100mM β-Mercaptoethanol, 1,33mg/ml ONPG) in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Sobald sich die Mischung gelb verfärbte, wurden je Well 150µl 1M Tris-Puffer (pH8) hinzupipettiert und die Intensität bei 414nm gemessen.

Die Berechnung der relativen Luciferase-Aktivität erfolgte als Quotient aus dem absolutem Luciferase-Wert und der OD β-Galaktosidase. Jede Bedingung wurde in 3 oder 4 biologischen Replikaten angesetzt, die als Duplikate vermessen wurden.

3.2.4.5 Proteasomen-Funktions-Messung

3.2.4.5.1 Analyse der Protein-Menge nach Zugabe von Proteasom-Inhibitor

HEK293T Zellen wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und einen Tag später mit FuGene 6 transfiziert. Je 12-Well wurden 2µg phMR3750-Plasmid in die Zellen eingebracht und die Zellen für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin entweder mit den Proteasom-Inhibitoren Epoxomicin (10nM, 100nM, 1µM und 10µM in DMSO) bzw. MG132 (100nM, 1µM in DMSO) oder nur mit DMSO (Kontrolle; 0,1%, 1%) stimuliert.

Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden bei 37°C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 200µl 1x-Probenpuffer abgeschabt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben auf ein 7,5% Acrylamid-SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Nach dem Blocken mit 5% Milch in TBS-T wurde der Blot über Nacht mit anti-MR-Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen wurde der Blot eine Stunde mit HRP-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper inkubiert und nach erneutem Waschen mit LumiLight® detektiert.

3.2.4.5.2 Promotoraktivität

HEK293T-Zellen wurden auf 12-Well Platten ausgesät, dem Kulturmedium wurde 10% Kohle-behandeltes (steroidfreies) Serum zugesetzt. Am nächsten Tag wurden die Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte mit FuGene 6 transfiziert. Pro 12-Well wurden 1µg Reporter-Gen-Plasmid MMTV-Luc, 1µg Expressionsplasmid phMR3750, sowie 1µg pSV-β-Galaktosidase-Vektor als Kontrolle in die Zellen transfiziert und anschließend in serumfreiem Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen entweder mit 1nM Aldosteron oder nur mit Ethanol stimuliert. Zusätzlich wurden entweder 10 oder 100nM Proteasom-Inhibitor Epoxomicin (in DMSO) oder nur DMSO auf die Zellen gegeben und für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Luciferasen luminometrisch bestimmt. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde photometrisch bei 414nm gemessen (siehe 3.2.4.4).

3.2.4.6 Proteinidentifizierung durch „peptide mass fingerprint“ (MALDI)

Beim MALDI-Verfahren (**M**atrix-**a**ssisted **L**aser **d**esorption **i**onization) werden die zu untersuchenden Proteine in eine Matrix eingebaut. Als Matrix-Substanzen eignen sich UV-absorbierende Moleküle, die die Fähigkeit zur Kokristallbildung und zum Protonentransfer besitzen. Die sauren Matrix-Moleküle übertragen Protonen auf die Proteine und laden sie so positiv auf. Die Proteinkristalle werden dann ins Hochvakuum des Massenspektrometers eingebracht und mit einem Laser beschossen. Dadurch werden sowohl Moleküle aus der Matrix wie auch die eingebauten Proteinionen

freigesetzt. Die positiv geladenen Proteinionen gehen in die Gasphase über und werden im elektrischen Feld beschleunigt. Hierbei ist die Fluggeschwindigkeit zum einen von der Ladung, zum anderen von der Masse der Proteine abhängig.

Gemessen wird die Zeit, die die Ionen benötigen, um den Flugzeitanalysator (TOF = time of flight) zu durchfliegen, bevor sie vom Detektor erfasst werden.

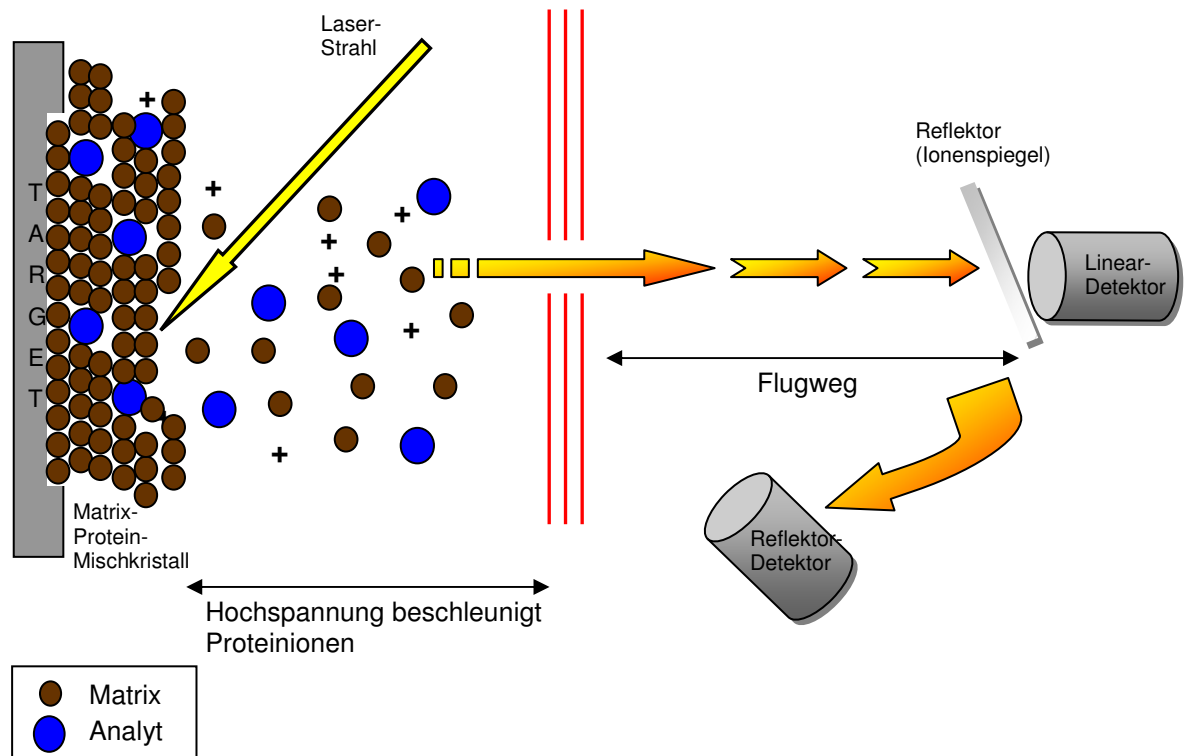


Abbildung 25 Funktionsweise des MALDI

Vor der eigentlichen Messung im MALDI mussten die Proben zuerst einem Verdau mit einem proteolytischen Enzym unterzogen werden. Danach erfolgte eine Aufreinigung über ZipTip[®]-Säulen, bevor die Probe auf das MALDI-Target gespottet wurde.

3.2.4.6.1 In-Gel Trypsinverdau

Im SDS-Gel aufgetrennte Proteine wurden für die massenspektrometrische Analyse aus dem Gel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und dann aus dem Gelstück eluiert.

Zum Waschen und Neutralisieren wurden die Banden nach dem Ausschneiden für 15 Minuten mit Acetonitril, anschließend für weitere 15 Minuten mit Ammoniumhydrogencarbonat und wiederum für 15 Minuten mit Acetonitril überschichtet. Im Anschluss wurden die Gelstücke reduziert und alkyliert. Hierfür wurden sie 60 Minuten bei 56°C mit Reduktionspuffer überschichtet und danach mit Alkylierungsreagenz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein 15-minütiger Waschschriff mit Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung. Danach wurden die Banden zweimal mit Acetonitril für jeweils 15 Minuten gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und die Gelstücke

im Vakuum (SpeedVac) getrocknet. Die getrockneten Gelstücke wurden schließlich mit Trypsin-Lösung bedeckt für 4 Stunden bei 37°C verdaut.

3.2.4.6.2 ZipTip®-C18-Peptidaufreinigung

Die Proben wurden vor der Analyse durch Massenspektrometrie aufgrund ihres Salzgehaltes durch Aufziehen in ZipTip®-Spitzen aufgereinigt. Die Pipettenspitzen wurden durch dreimaliges Aufziehen von 50% Acetonitril in Wasser aktiviert und anschließend dreimal mit 0,1%TFA in Wasser äquilibriert. Danach wurde die Probe dreimal durch die ZipTip®-Spitze aufgezogen. Nach Waschen mit 0,1%TFA wurden die Peptide durch Aufziehen von Matrix (Cyanohydroxyzimtsäure in Acetonitril/Wasser) direkt auf das Target eluiert.

Reduktionspuffer:

10mM DTT in 50mM NH₄HCO₃

Alkylierungsreagenz:

50mM Iodacetamid in 50mM NH₄HCO₃

Trypsinlösung:

Stammlösung (Promega) 1mg/ml

20µl Stammlösung

70µl 50mM NH₄HCO₃

3.2.4.6.3 Auswertung der Massenspektren

Die Identifizierung von Proteinen anhand der Massen der tryptischen Peptide erfolgte mit Hilfe der Suchmaschine MASCOT der Firma Matrixscience⁶⁷.

Hierbei erfolgt ein Vergleich der theoretischen Massen aus dem Verdau der in einer Datenbank registrierten Proteine mit den experimentell erhaltenen Massenwerten. Die Übereinstimmung wird durch einen Zahlenwert, den Score, ausgedrückt, der mit der Irrtumswahrscheinlichkeit (p) korreliert. In dieser Arbeit wurden nur Zuordnungen akzeptiert, die $p < 0,001$ entsprachen, in den meisten Fällen lag dieser Wert mehrere Größenordnungen niedriger. Einige Proben wurden darüber hinaus durch Subfragmentierung der tryptischen Peptide an einem Ultraflex ToF/ToF Gerät (Bruker, Universität Kaiserslautern, AG Prof. Niedner-Schatteburg) weiter charakterisiert. In allen Fällen wurde die aus dem Peptidmassen-Fingerprint abgeleitete Zuordnung bestätigt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Molekularer Mechanismus der Wirkung von Aldosteron im distalen Tubulus und Sammelrohr sowie Crosstalk mit RGS3, GDI2, ARL7 und GRK5

4.1.1 Real-time PCR

4.1.1.1 Etablierung der Real-time PCR

Um quantitative Aussagen über die Expression bestimmter Gene treffen zu können, ist es unbedingt nötig, eine PCR im Real-time Verfahren durchzuführen. Hierfür sind optimale Cycling-Bedingungen Voraussetzung, die mit Hilfe von Standardgenen (z.B. GAPDH) ermittelt werden. Nach Isolierung der Gesamt-RNA von DTEC-Zellen (Kap. 3.2.2.1) wurde die isolierte RNA-Menge bestimmt und hiervon jeweils 5µg zur Synthese von cDNA verwendet (s. Kap. 3.2.2.2).

Die cDNA wurde in 10-fach Verdünnungsschritten verdünnt (100ng, 10ng, 1ng, 100pg) und für die Real-time PCR eingesetzt. Neben Annealing- und Elongationszeiten mussten außerdem die MgCl₂-Konzentration sowie die eingesetzte Primermenge optimiert werden. Als Fluoreszenzfarbstoff für die Real-time PCR diente SYBR®-Green.

<i>Gen</i>	<i>Annealing-Temp</i>	<i>[MgCl₂]_{Endkonz.}</i>	<i>[Primer]_{Endkonz.}</i>
GAPDH	58 °C	2,5mM	500nM
Sgk1	60 °C	2,5mM	500nM
RGS3	62 °C	2,5mM	500nM
GDI2	60 °C	2,5mM	500nM
GRK5	60 °C	2,5mM	500nM
	Zusätzlicher Detektionsschritt nach der Elongation bei 85 °C		
ARL7	60 °C	2,5mM	500nM

Tabelle 11 Ermittelte Real-time PCR Bedingungen

Der verwendete Farbstoff SYBR®-Green interkaliert in jede doppelsträngige DNA. Um die Amplifizierung unspezifischer Produkte während der PCR ausschließen zu können, wurde im Anschluss an jeden PCR-Lauf eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Hiermit können verschiedene Amplifikate oder Primer-Dimere charakterisiert werden. Außerdem wurde die richtige Produktgröße zusätzlich durch Auftragen der Proben nach dem PCR-Lauf auf ein Agarosegel überprüft.

Das Housekeeping Gen GAPDH wurde als interner Standard genutzt, da dieses Gen als konstant exprimiert angenommen wird. Unterschiedliche Mengen oder Qualitäten der eingesetzten, zu amplifizierenden DNA können so durch das Verhältnis von Transkriptmenge des Housekeeping Gens und des zu untersuchenden Gens ausgeglichen werden.

4.1.1.2 Ergebnisse

Vorversuche von Dr. M. Kellner mittels konventioneller, semiquantitativer PCR ließen vermuten, dass durch Aldosteron in einigen der ausgewählten Gene eine spezifische Induktion ausgelöst werden kann. Diese ersten Daten sollten mit der genaueren und daher aussagekräftigeren Light Cycler Methode bestätigt werden.

In Abbildung 26 und Abbildung 27 sind jeweils die so genannten Crossingpoints dargestellt. Als Crossingpoint ist die jeweilige Zyklenzahl definiert, bei der die Fluoreszenz des gemessenen Transkripts die Hintergrund-Fluoreszenz erstmals übertrifft. Der Crossingpoint kennzeichnet den Start einer detektierbaren Amplifikation der Probe und ist von deren Anfangskonzentration abhängig. Die Crossingpoints wurden auf das Referenzgen GAPDH normiert.

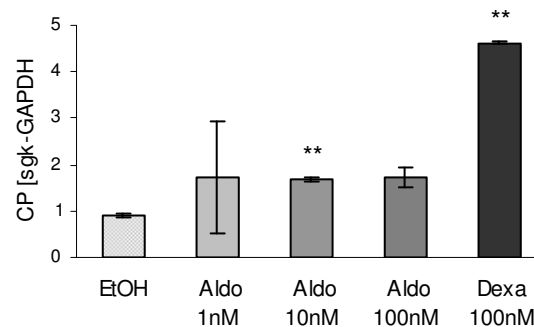


Abbildung 26 Induktion von Sgk1 durch Aldosteron und Dexamethason in primären DTEC-Zellen, bestimmt über Real-time PCR. Mittelwert aus zwei separaten Messungen mit jeweils zwei unterschiedlichen Proben, n=4. ** p<0,01 beim T-Test. CP Crossingpoint

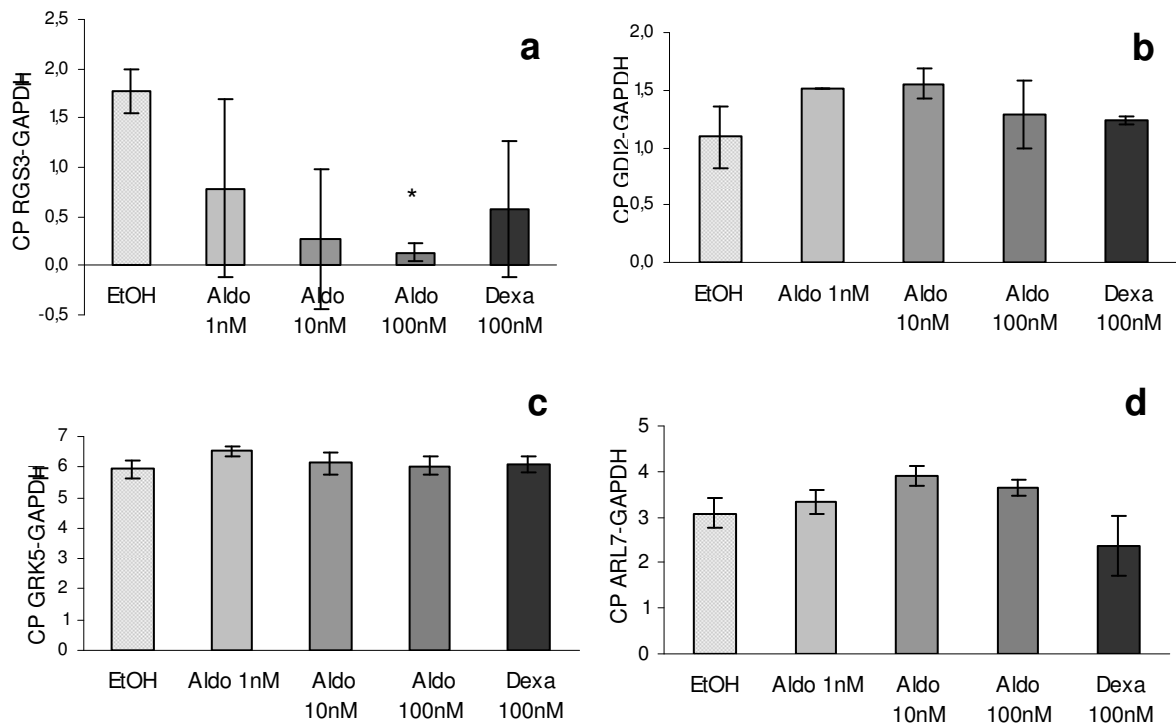


Abbildung 27 Überprüfung der Expression von (a) RGS3 (b) GDI2 (c) GRK5 (d) ARL7 nach Stimulation mit Aldosteron und Dexamethason in DTEC-Zellen. Mittelwert aus zwei separaten Messungen mit jeweils zwei unterschiedlichen Proben (n=4). *Aldo* Aldosteron, *Dexa* Dexamethason, *EtOH* Ethanol. * p<0,05 Aldo bzw. Dexa vs. EtOH beim T-Test

Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, war keines der untersuchten Gene GRK5, GDI2 und ARL7 nach Stimulation mit Aldosteron (1nM, 10nM, 100nM) oder Dexamethason (100nM) im Vergleich zur Ethanolkontrolle differentiell reguliert worden. Nur für RGS3 war eine herabgesetzte Expression nach Stimulation mit Aldosteron und Dexamethason zu beobachten, was mit den Array Daten (Dr. M. Kellner) übereinstimmte. Aufgrund der großen Standardabweichung wurde jedoch nur bei einer eingesetzten Konzentration von 100nM Aldosteron eine signifikante Herabsetzung der Expression ermittelt.

Es zeigte sich, dass die Ergebnisse bei Verwendung verschiedener Isolate weitaus variabler waren, als dies die ersten Versuche erkennen ließen. Die als Kontrolle eingesetzte Stimulation von Sgk1 durch Dexamethason war gut reproduzierbar. Eine Induktion durch Aldosteron war für Sgk1 jedoch nur bei einer Konzentration von 10nM signifikant. Da über die meisten der vier ausgewählten Gene bisher noch wenig bekannt ist, war für die Expression dieser Gene leider kein Stimulus bekannt, der als Positivkontrolle hätte dienen können. Nachdem zumindest für RGS3 tendenziell eine Übereinstimmung mit den Array-Daten erzielt wurde, sollten die vier Gene in einen Expressionsvektor subkloniert (s. Kap. 4.1.2) und stabil in M1-Zellen transfiziert werden (s. Kap. 4.1.3), um im Anschluss weitere funktionelle Untersuchungen durchzuführen.

4.1.2 Subklonierung von RGS3, GDI2, ARL7, und GRK5 in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo

Die vier beschriebenen Gene wurden zum Teil als IMAGE Klone bezogen oder von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Um Aussagen über Unterschiede in der Funktionalität treffen zu können, müssen alle Gene in demselben Vektor vorliegen. Daher wurden zunächst alle vier Gene in den gleichen Vektor subkloniert. Hierfür wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo (+) bzw. (-) ausgewählt (s. Abbildung 28).

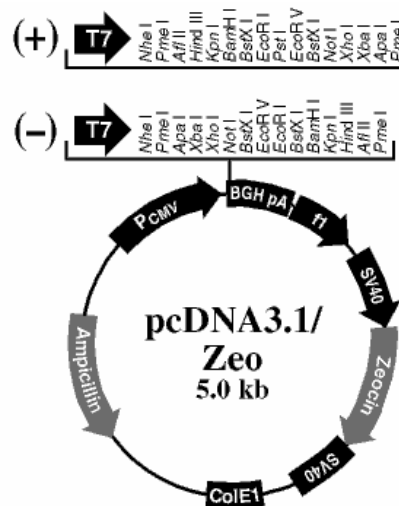


Abbildung 28 pcDNA3.1/Zeo Expressionsvektor

GRK5 wurde aus dem Expressionsvektor pcDNA3-GRK5 (Dr. J. Benovic, Thomas Jefferson University, Philadelphia) durch Restriktionsverdau mit BamHI und XbaI ausgeschnitten (s. Kap. 3.2.2.9). Der gesamte Verdauansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, die Bande der richtigen Größe ausgeschnitten und mittels Glasmilch aufgereinigt (s. Kap. 3.2.2.8). Der Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) wurde dementsprechend im Anschluss an einen Restriktionsverdau mit BamHI und XbaI auf ein Agarosegel aufgetragen, die Bande ausgeschnitten und schließlich mit dem QIAEX Gel Extraction Kit[®] aufgereinigt. Anschließend wurde der geschnittene Vektor mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (s. Kap.3.2.2.10). Die Phosphatase wurde 10 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert. Um das Enzym vollständig aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde der Vektor zusätzlich mit dem Qiaquick Nucleotide Removal Kit[®] aufgereinigt (s. Kap. 3.2.2.6). Geschnittener, dephosphorylierter Vektor und geschnittenes Gen wurden über Nacht bei 14°C ligiert (s. Kap. 3.2.2.12). Der Ligationsansatz wurde in kompetente XL1blue E.coli Zellen transformiert und auf LB-Ampicillin-Selektionsagar ausplattiert (s. Kap. 3.2.2.13). Nach der Plasmidpräparation wurden positive Klone über einen

Kontrollverdau identifiziert. Die korrekte Sequenz wurde zusätzlich durch Sequenzierung (Firma MWG) bestätigt.

Die Klonierung der anderen drei Gene in den Expressionsvektor erfolgte entsprechend. RGS3 wurde über Restriktionsverdau mit HindIII und XbaI aus dem Vektor pRC/CMV-RGS3 (Prof. Wieland, Universität Heidelberg) ausgeschnitten und in pcDNA3.1/Zeo(+) ligiert. GDI2 und ARL7 wurden als IMAGE-Klone vom Ressourcenzentrum RZPD (Berlin) bezogen und lagen beide im Vektor pOTB vor. Aus diesem Plasmid wurden sowohl GDI2 als auch ARL7 (Image-Klon p958/13185Q2) via Verdau mit EcoRI und XhoI in pcDNA3.1/Zeo(+) subkloniert.

4.1.3 Stabile Transfektion der klonierten Expressionskonstrukte in M1-Zellen

Da bei einer transienten Transfektion von M-1 Zellen mit FuGene 6 auch nach Optimierung aller Bedingungen nur Transfektionseffizienzen von maximal 10% erreicht wurden, mussten zunächst stabile Klone entwickelt werden. RGS3, ARL7, GDI2 und GRK5 wurden wie in Kap. 4.1.1 beschrieben alle in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo subkloniert, welcher für Resistenz gegenüber Zeocin kodiert. Zur Selektion positiver Klone wurde dieses in einer Konzentration von 300 µg/ml eingesetzt.

Die Verwendung dieser Klone wirft jedoch zusätzliche Probleme auf, da die stabile Transformation zu nicht vorhersagbaren, sekundären Effekten durch die (zufällige) Integration in das Wirtsgenom führen kann. Deshalb wurden immer mehrere unabhängige Klone parallel funktionell untersucht.

4.1.4 Eigenschaften und Expression

Zur Überprüfung der Expression der stabil transfizierten Zellen wurde RNA isoliert und hieraus durch Reverse Transkription cDNA synthetisiert. Diese wurde für eine anschließende PCR mit spezifischen Primern (s. Tabelle 5) eingesetzt, in der die überexprimierten Gene nachgewiesen werden konnten.

Während in allen untersuchten GDI2, GRK5 und ARL7 Klonen die stabil transfizierten Gene mit konventioneller PCR nachgewiesen werden konnten, wurde ausschließlich der Klon D1 als RGS3 überexprimierend nachgewiesen (s. Abbildung 29). Die Zellen dieses Klons unterschieden sich deutlich in Aussehen und Größe von den übrigen Klonen. Während sich die anderen Klone kaum in Aussehen und Wachstum von Wildtypzellen unterschieden, zeigte Klon D1 ein auffällig langsames Wachstum sowie Veränderungen in der Morphologie der Zellen: die Zellen waren kleiner, zudem waren größere Zwischenräume zwischen den Zellen zu erkennen:

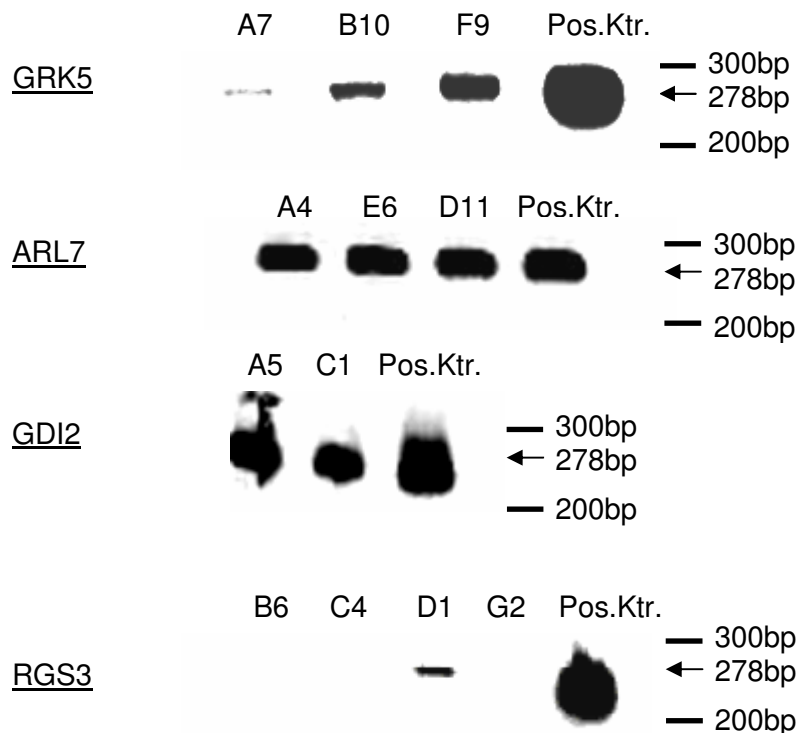


Abbildung 29 Nachweis der Expression von GDI2, GRK5, RGS3 und ARL7 in stabil transfizierten M1-Zellen durch PCR.

4.1.5 Einfluss von RGS3, GDI2, ARL7 und GRK5 auf Zellproliferation und Proteinsyntheserate

Die mögliche Wirkung der ausgewählten Gene auf Zellproliferation und Proteinsyntheserate als Surrogatparameter für Hypertrophie wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin (Proliferation) bzw. ^3H -Leucin (Proteinsynthese) bestimmt (vgl. Kap.3.2.4.3). Die Messungen erfolgten anhand der stabil transfizierten M1-Zellklone. Es war jedoch für keines der vier untersuchten Gene ein signifikanter Einfluss auf Zellproliferation oder auf Proteinsynthese zu beobachten.

Die Ergebnisse aus ^3H -Thymidin und ^3H -Leucin-Assay zeigten insgesamt, dass alleine das Einbringen von leerem Vektor physiologische Effekte auslöste und die Messwerte bereits für die beiden Klone, die lediglich den leeren Vektor exprimierten, sehr variabel waren. Die Messergebnisse der untersuchten Klone GDI2, ARL7, RGS3, und GRK5 lagen im Bereich der Werte, die für den leeren Vektor ermittelt worden waren. Daher erschien es nicht Erfolg versprechend, weitere stabile Klone herzustellen und die Versuche mit diesen Klonen zu wiederholen. In Abbildung 30 sind beispielhaft die Ergebnisse aus ^3H -Thymidin und ^3H -Leucin-Assay für ARL7 und GDI2 dargestellt.

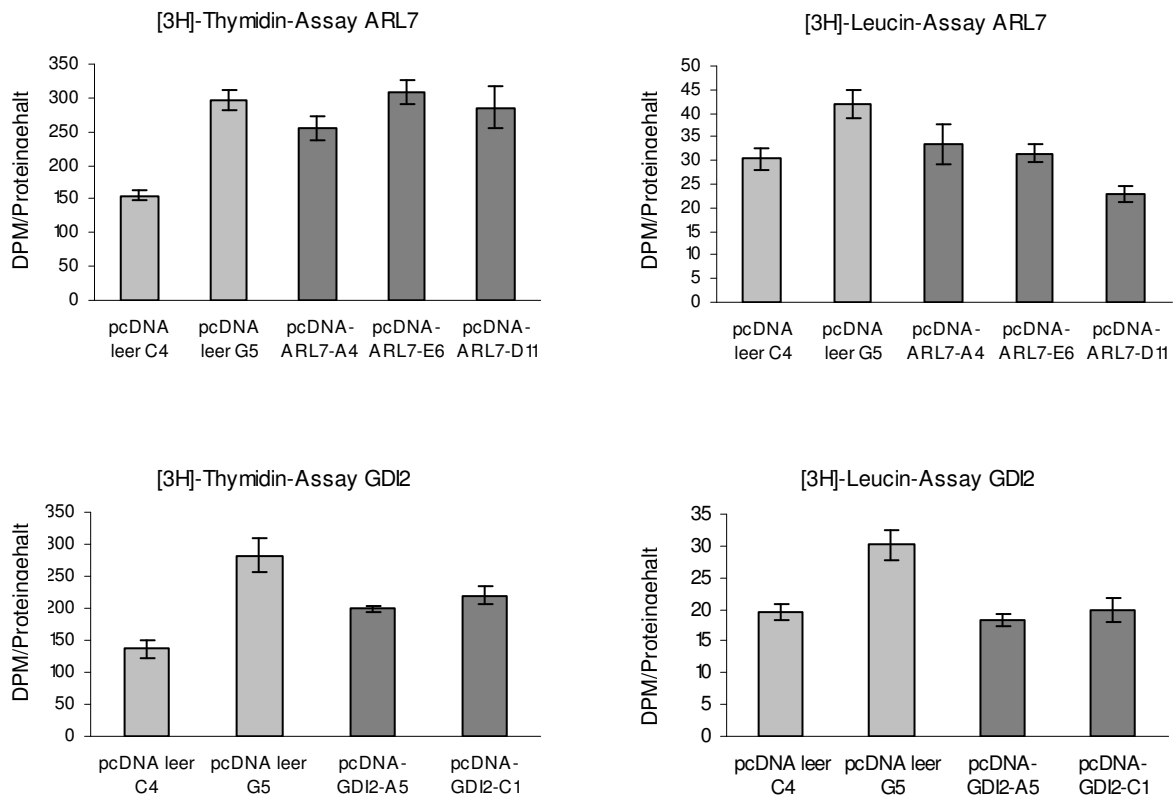


Abbildung 30 Überprüfung von Zellproliferation und Proteinsyntheserate in stabil transfizierten M1-Zellen am Beispiel der überexprimierten Gene GDI2 und ARL7.

4.1.6 Wirkung von Aldosteron auf G-Protein gekoppelte Signalwege

An den DTEC Isolaten wurden daneben auch funktionelle Tests durchgeführt, um zu prüfen, ob sich Aldosteron-induzierte Veränderungen der zellulären Eigenschaften nachweisen lassen.

Ein Crosstalk zwischen dem Adenylylcyclase/cAMP-System und Steroid-Rezeptoren wurde von mehreren Autoren postuliert⁶⁸⁻⁷⁰. Massaad und Kollegen⁴⁷ zeigten z.B. in Abwesenheit von Aldosteron eine Aktivierung des MR durch cAMP, einen Stimulus für die Proteinkinase A (PKA).

Für Untersuchungen in dieser Arbeit wurden als Stimuli Dopamin, Parathormon (PTH), Vasopressin, Isoprenalin und Calcitonin eingesetzt. Diese Stimuli üben alle via Aktivierung oder Hemmung des Adenylylcyclase (AC)-Systems Wirkungen auf Funktionen des distalen Tubulus aus. Eine Aktivierung der AC resultiert in einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. cAMP führt schließlich zur Aktivierung cAMP-abhängiger Proteinkinasen, die ihrerseits zahlreiche Proteine phosphorylieren und hierdurch physiologische Effekte auslösen können.

Dopamin wirkt über Adrenozeptoren oder spezifische Dopamin-Rezeptoren. Es sind inzwischen 5 Dopamin-Rezeptoren bekannt. Eine Stimulation von D₁ und D₅-Rezeptoren

(Typ 1) bedingt eine Aktivierung der AC, eine Stimulation von D_2 , D_3 und D_4 Rezeptoren (Typ 2) hingegen eine Hemmung der AC. Auf glatten Muskelzellen von Nierengefäßen, auch des distalen Tubulus, sind D_1 -Rezeptoren vorzufinden. Eine Stimulation von D_1 -Rezeptoren in der Niere führt zu einer Dilatation der Nierengefäße und zu einer vermehrten Durchblutung.

PTH erhöht durch die Aktivierung der AC die Rückresorption von Calcium- und Magnesiumionen im distalen Tubulus und fördert die Ausscheidung von Phosphat im proximalen Tubulus. Außerdem stimuliert PTH die Bildung von Calcitriol, der aktiven Form von Vitamin D_3 .

Vasopressin führt über einen Angriff an basolateralen V_2 -Rezeptoren in der Niere zu einer Aktivierung der AC und damit zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration (vgl. Abbildung 14). Hierdurch werden vermehrt Aquaporine in die Zellmembran eingebaut; die Zellen werden wasserpermeabel. Vasopressin wird daher auch als antidiuretisches Hormon (ADH) bezeichnet. Zum anderen wird durch die erhöhte cAMP-Konzentration der ENaC vermittelte Natriumeinstrom verstärkt.

Das β -Sympathomimetikum Isoprenalin greift sowohl an β_1 als auch an β_2 Adrenozeptoren an. Auch hieraus resultiert eine Aktivierung der AC.

Calcitonin bewirkt eine Aktivierung der AC. Es fördert in der Niere die Ausscheidung von Phosphat-, Calcium-, Natrium-, Kalium- und Magnesiumionen.

DTEC Zellen wurden zuerst einer Vorinkubation von fünf Stunden mit 100nM Aldosteron unterzogen. Diese längere Inkubationszeit ist erforderlich, um aus den nach zwei Stunden detektierten mRNAs ausreichende Mengen an Protein zu synthetisieren. Anschließend erfolgte ein weiterer Vorinkubationsschritt von 30 Minuten mit PSS. Dem Puffer wurde zusätzlich der unspezifische Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor IBMX zugesetzt, so dass Veränderungen im gemessenen cAMP-Gehalt auf eine Veränderung der AC-Aktivität und nicht auf eine veränderte PDE-Aktivität zurückzuführen waren.

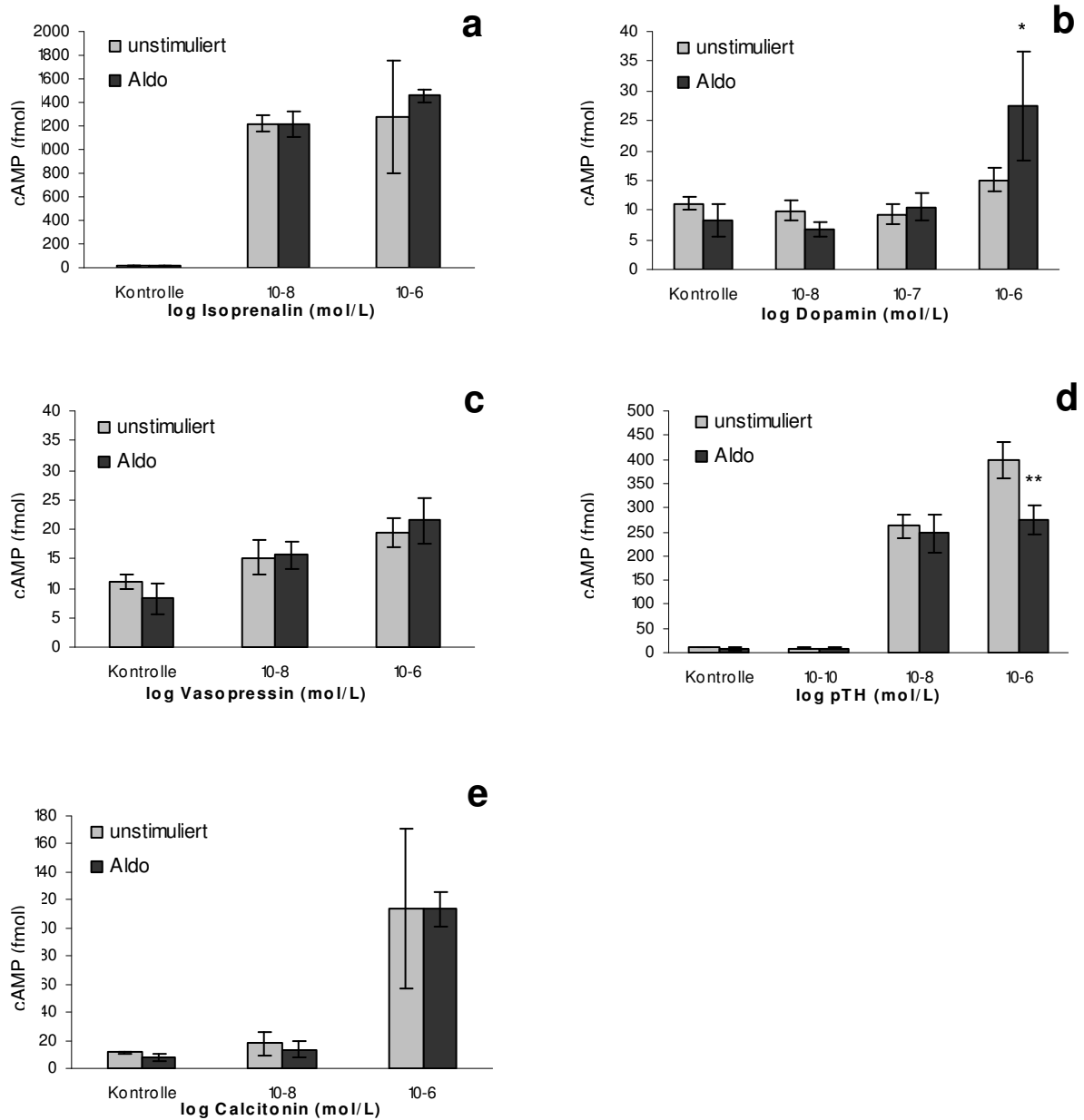


Abbildung 31 Modulation der cAMP-Synthese durch Aldosteron nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli (a) Isoprenalin (b) Dopamin (c) Vasopressin (d) Parathormon (e) Calcitonin. Es erfolgte eine Vorinkubation von 6h mit 100nM Aldosteron oder mit Ethanol. n=4. * p<0,05, ** p<0,01 Aldo vs. unstimuliert beim T-Test

Eine Stimulation mit Isoprenalin (10^{-8} und 10^{-6} M) löste erwartungsgemäß einen deutlichen Anstieg der cAMP-Konzentration (1200-fach) aus. Es waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Vorinkubation mit oder ohne Aldosteron zu beobachten. Auch Calcitonin (10^{-6} M) führte zu einer Steigerung der cAMP-Synthese (11-fach), zeigte sich jedoch unbeeinflusst von einer Inkubation mit Aldosteron. Vasopressin erzeugte nur einen leichten Anstieg der cAMP-Synthese, der ebenfalls nicht durch Aldosteron modifiziert wurde.

Die cAMP-Produktion wurde durch PTH in Konzentrationen von 10^{-8} und 10^{-6} M um den Faktor 250 im Vergleich zur Kontrolle induziert. Eine Stimulation mit Aldosteron zeigte bei einer PTH-Konzentration von 10^{-8} M zwar keinen Effekt, führte bei 10^{-6} M PTH jedoch zu einer signifikanten Verringerung der Synthese von cAMP.

Zudem ließ sich bei diesen Messungen eine signifikante Verstärkung der Dopamin (10^{-6} M) induzierten cAMP Produktion durch Aldosteron nachweisen.

Allerdings waren diese funktionellen Antworten bei Verwendung weiterer Isolate erheblichen Schwankungen zwischen den Isolaten unterworfen.

4.1.7 Elektrophysiologische Messungen in der Ussing-Kammer

Als wichtiger Parameter für die Funktionsweise der distal tubulären Epithelzellen sollten parallel elektrophysiologische Messungen der Ionenströme durchgeführt werden, weil diese direkt mit der physiologischen Funktion korrelierbar sind. Hierfür wurden in Zusammenarbeit mit Prof. H. Mairbürl (Medizinische Klinik VII, Heidelberg) Messungen an einer modifizierten Ussing-Kammer durchgeführt.

Die Hauptwirkung von Aldosteron im distalen Tubulus besteht in einem Einfluss auf den Ionenstrom. Daher sollte in elektrophysiologischen Untersuchungen ein Ko-modulatorischer Einfluss von Aldosteron auf andere Stimuli an DTEC untersucht werden. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit und schwierigen Handhabung von DTEC wurden die Ussing-Kammer-Versuche zunächst in einem Modellsystem etabliert.

4.1.7.1 Etablierung der Ussing-Kammer-Methode

Zur Etablierung dieser Methode wurden M1-Zellen ausgewählt, da diese zum einen leichter zu handhaben sind als DTEC-Zellen und im Unterschied zu DTEC unbegrenzt verfügbar sind. M1-Zellen sind eine murine Sammelrohr-Zelllinie, die aus dem mikroseziierten Sammelrohr gewonnen und mit dem large T Antigen des SV40 Virus immortalisiert wurde und viele Eigenschaften des Sammelrohrs beibehalten hat. Das Sammelrohr ist ein klassisches Zielorgan für Aldosteron und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Na^+ -Reabsorption.

Zunächst musste der optimale Zeitabstand nach der Zellaussaat ermittelt werden, in dem M1-Zellen für das Sammelrohr charakteristische Transporteigenschaften entwickeln.

Hierfür wurden die Zellen in DMEM-F12 Medium inklusive 10% FKS auf permeablen Supports (Transwell, Costar) kultiviert. Im Abstand von 2 Tagen erfolgten Mediumwechsel und die Überprüfung von Spannung und transepithelialelektrischen Widerstand (TEER) durch Messung mit einem Epithel-Voltohmmeter (EVOM). Diese Messungen wurden unter der Sterilbank durchgeführt und es wurde darauf geachtet, dass sie innerhalb eines möglichst kurzen Zeitraums erfolgten, um eine Drift in den Messwerten durch Veränderungen von pH und Temperatur zu vermeiden. Zudem wurden Messungen mit dem EVOM jeweils vor einem Mediumwechsel durchgeführt, da Erschütterungen der Zellen beim Mediumwechsel bei direkt anschließenden Messungen zu einem Abfall des Widerstandes führen können.

Ohne weitere Zusätze zum Kulturmedium konnte lediglich eine geringe Zunahme des epithelialen Widerstandes beobachtet werden. Nach Zusatz von 100nM Dexamethason zum Medium wuchsen M1-Zellen hingegen auf permeablen Supports zu gut messbaren, elektrisch dichten Präparationen heran. Nach sechs Tagen konnten, wie in der Literaturvorschrift, epitheliale Widerstände im Kilo-Ohm-Bereich erzielt werden.

M1-Zellen hatten sechs bis acht Tage nach der Aussaat Widerstände über 1000 Ohm und Spannungen zwischen 1 und 3 mV erreicht. Sie wurden dann für 24 Stunden ohne Dexamethason und Serum kultiviert, bevor sie für Messungen in der Ussing-Kammer eingesetzt wurden. Alle Messungen wurden bei 37°C durchgeführt. Apikale und basolaterale Seite wurden mit Kulturmedium DMEM befüllt.

Entsprechend den Beobachtungen von Nakhoul et al.⁷¹ mit M1-Zellen konnten auch bei diesen Versuchen zwei Dinge festgestellt werden. (1) Der prozentuale Anteil erfolgreicher Messungen in der Ussing-Kammer war relativ gering, da häufig keine stabilen Werte erzielt werden konnten. (2) Nach Einbringen der permeablen Membranen in die Kammer war nach einer kurzen Lagphase mehrfach ein Abfallen des Widerstandes der Zellen zu beobachten. Wenn hingegen stabile Messungen möglich waren, war der Widerstand, der in der Ussing-Kammer erlangt wurde, deutlich geringer als der mit dem EVOM ermittelte Wert (zwischen 30 und 60%). M1-Zellen scheinen dementsprechend sehr empfindlich gegenüber Einflüssen wie pH-Wert und Temperatur zu sein. Nakhoul et al. erklären dies mit einem Verlust der Integrität des Monolayers, vermutlich durch eine Beeinflussung der tight junctions und infolgedessen einem verminderten Transport bereits nach minimalen Erschütterungen.

Die mit M1-Zellen in der Literatur angegebenen funktionellen Befunde konnten, wie nachfolgend beschrieben, reproduziert werden.

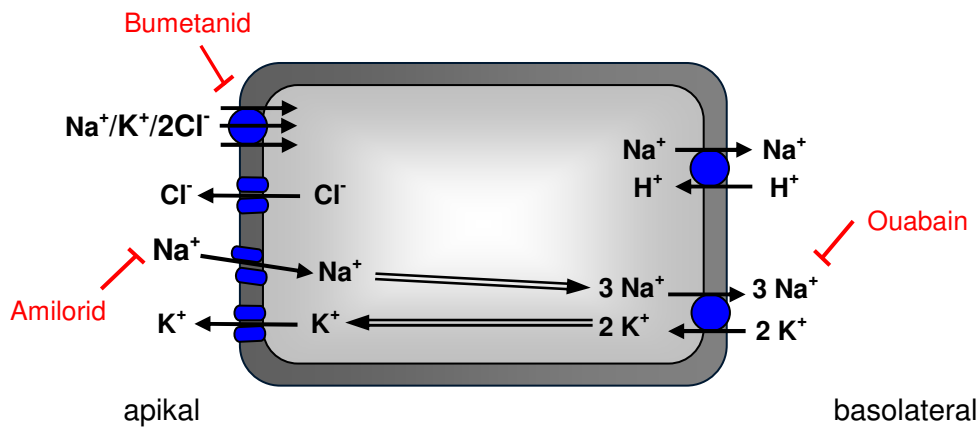
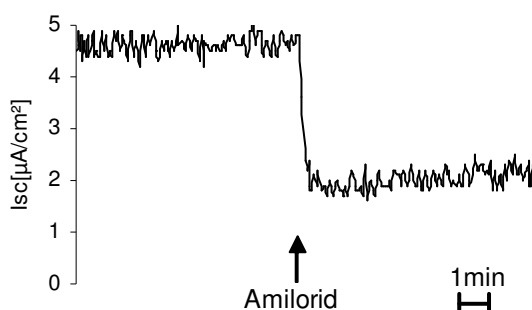


Abbildung 32 Schematische Darstellung des epithelialen Transports im Sammelrohr

Der epitheliale Natriumtransport im Aldosteron-sensitiven Tubulus und Sammelrohr erfolgt durch den apikalen Natriumeinstrom über Natriumkanäle, die durch Amilorid hemmbar sind, und den basolateralen Ausstrom von Natrium über Ouabain-sensitive Natrium-Kalium-Transporter (s. Abbildung 32), wodurch ein osmotischer Gradient zwischen apikaler und basolateraler Seite entsteht. Sammelrohrzellen exprimieren zudem in der apikalen Membran den CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), über den Chlorid-Ionen cAMP abhängig ausgeschleust werden^{72,73}. Dabei fungiert der CFTR als negativer Regulator für die Funktion des ENaC^{74,75}. Dieser Effekt wird zumindest teilweise durch Cl⁻ vermittelt^{76,77}. Wahrscheinlich spielt aber ebenfalls eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen CFTR und ENaC^{78,77} oder eine indirekte Interaktion über Zytoskelett-Strukturen oder regulatorische Proteine eine Rolle⁷⁷.

Über transepitheliale Messungen des Kurzschlussstroms (*short circuit current*) I_{sc} können diese Veränderungen im Ionenstrom erfasst werden. Die Messungen wurden in einer modifizierten Ussing-Kammer im Voltage-clamp Modus durchgeführt (s. Kap. 3.2.4.1.3). So konnten nach Zugabe von Inhibitoren zum apikalen oder basolateralen Kompartiment schnelle Änderungen im Ionenstrom verfolgt werden.



Die Zugabe von Amilorid (100µM) zur apikalen Seite verursachte eine sehr schnelle Reduktion des Kurzschlussstroms I_{sc} , was darauf hindeutet, dass ein großer Teil des Kurzschlussstroms durch einen Amilorid-sensitiven Natriumeinstrom (ENaC) erzeugt wird.

Abbildung 33 Apikal Amilorid erzeugte eine sehr schnelle Reduktion von I_{sc}

Um den Transport über die apikale oder basolaterale Membran zu messen, wurde Amphotericin B verwendet. Dieses bildet Komplexe mit Sterolen aus der Membran und verursacht so die Entstehung von Kanälen in der Membran, wodurch diese permeabilisiert wird. Amphotericin B wurde jeweils zum entgegen gesetzten Kompartiment in einer finalen Konzentration von $7,5\mu\text{M}$ oder $50\mu\text{M}$ zugegeben. Die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase konnte daraufhin durch Zugabe von 5mM Ouabain zur basolateralen Seite gehemmt werden, was sich durch einen sehr schnellen Anstieg im Kurzschlussstrom bemerkbar machte.

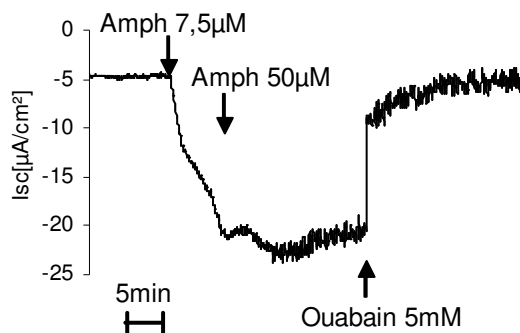


Abbildung 34 Permeabilisierung der apikalen Membran durch Amphotericin B in steigender Konzentration und anschließende Hemmung der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase durch 5mM Ouabain. Die Zugabe von 5mM Ouabain zum basolateralen Kompartiment resultierte in einem Anstieg von Isc. *Amph* Amphotericin B

Die basolaterale Zugabe von Noradrenalin induzierte biphasische Veränderungen im Kurzschlussstrom. $10\mu\text{M}$ Noradrenalin erzeugten einen schnellen Anstieg von Isc um $4\mu\text{A}/\text{cm}^2$ mit einem scharfen Peak, gefolgt von einem schnellen Abfall auf das Ausgangsniveau. Die Zugabe von Noradrenalin zur apikalen Membranseite hatte hingegen keinen Effekt.

Dieser stimulatorische Effekt von Noradrenalin wird wahrscheinlich über eine Stimulation der Cl^- -Sekretion hervorgerufen, in die basolateral gelegene $\alpha 1$ - und β -Adrenozeptoren involviert sind, während $\alpha 2$ -Adrenozeptoren keine Rolle zu spielen scheinen⁷⁹.

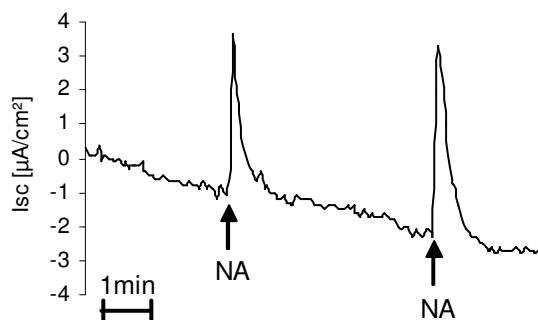


Abbildung 35 Basolaterales Noradrenalin ($10\mu\text{M}$) erzeugte einen transienten Anstieg in Isc NA Noradrenalin

4.1.7.2 Ergebnisse mit distal tubulären Epithelzellen

Nach Etablierung der Ussing-Kammer-Methode mit M1-Zellen sollten Messungen mit distal tubulären Epithelzellen durchgeführt werden.

DTECs entwickelten jedoch in mehreren Versuchsreihen keine elektrisch dichten Zellschichten. Sowohl der Zusatz von Dexamethason oder Insulin zum Kulturmedium als auch verschiedene Beschichtungen der Filtermembran (Collagen I, Collagen IV, Collagen IV plus FKS, Fibronectin, Gelatine) führten zu keiner Verbesserung. Nach acht Tagen Kultivierung auf beschichteten oder unbeschichteten Filtermembranen wurden maximale Widerstände zwischen 170 und 270 Ohm erreicht. Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Beschichtungen festgestellt werden. Diese Beobachtungen waren überraschend, da DTECs Zellschichten bilden, die für FITC-Dextran undurchlässig sind (Untersuchungen Dr. P. Baer, Universität Frankfurt), und daher davon auszugehen war, dass auch auf permeablen Supports elektrisch dichte Präparationen heranwachsen würden.

Auch nachdem die Membranen in die Ussing-Kammer eingebracht worden waren, wurden Widerstände von nur ca. 200 Ohm gemessen. Nach Stimulation der Zellen mit Amilorid oder Bumetanid wurden keine Veränderungen im Kurzschlussstrom beobachtet, was darauf zurückzuführen war, dass die Zellen keine dichten Zellschichten gebildet hatten.

Aus diesem Grund waren die primären DTEC Zellen für weitere Untersuchungen des Ionenstroms nicht zugänglich.

4.1.8 Zusammenfassung

In früheren Versuchen am Institut für Klinische Pharmakologie Mannheim wurde die schnelle Aldosteron-induzierte Expression in einer gemischten Population von humanen renalen Epithelzellen untersucht. Dabei wurden von 1400 untersuchten Genen 14 Gene identifiziert, die innerhalb von 90 Minuten signifikant reguliert waren. Auffälligerweise wurde die Induktion eines Gens (*gadd153*) weder durch RU486 noch durch Spironolacton inhibiert, was möglicherweise auf einen nichtklassischen Mechanismus hindeutet⁴⁴. In anderen Versuchen waren in verschiedenen definierten Nierenzellpopulationen schnelle, nicht-genomische Reaktionen auf Aldosteron beobachtet worden⁸⁰, unter anderem in Zellen des distalen Tubulusepithels (DTEC). Diese Zellen konnten ebenfalls mittels eines Expressionsarrays auf ihre Genexpression untersucht werden. Von 8300 untersuchten Genen wurden 79 Gene innerhalb von 2 Stunden signifikant reguliert. Aufgrund einer ersten Analyse wurden hiervon 20 Transkripte ausgewählt, deren Expression durch kompetitive PCR und/oder Northern Blot bestätigt wurde. Interessanterweise waren auch hierunter zwei Transkripte, deren Regulation weder durch RU486 noch durch Spironolacton gehemmt wurde.

Da die initialen Arbeiten von Dr. M. Kellner mit der recht hohen Aldosteron-Konzentration von 100nM durchgeführt worden waren, war ein wichtiges Ziel, diese Ergebnisse mit niedrigeren, physiologischen Aldosteron-Konzentrationen zu bestätigen. Unter den durch Aldosteron differentiell regulierten Proteinen wurden aufgrund von Datenbankrecherchen und publizierten Informationen über Signalwege vier Gene ausgewählt, deren mögliche Beteiligung an Aldosteronwirkungen in distalen Nierenzellen näher untersucht werden sollte. Hierfür wurde deren Einfluss auf Zellproliferation und Proteinsynthese sowie deren Wirkung auf G-Protein-gekoppelte Signalwege untersucht.

Neben *RGS3* (regulator of G-Protein signalling), das zur Familie der GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) gehört und vorwiegend in der Niere exprimiert wird, wurden *GDI2* (GDP-dissociation inhibitor) und *ARL7* (ADP-ribosylation like factors (ARFs) *ras*-verwandter GTPasen) näher untersucht, da diese beiden Gene möglicherweise eine interessante Rolle im Vesikel-Trafficking einnehmen. Da auch Aldosteron das Trafficking von Vesikeln beeinflusst, nämlich das von ENaC-Vesikeln an die Zellmembran, wäre ein Crosstalk mit *ARL7* oder *GDI2* denkbar. Weiterhin wurde *GRK5*, welches der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptor-Kinasen angehört, ausgewählt. *GRK5* wird in zahlreichen Geweben, auch in der Niere, exprimiert. Ein Crosstalk der genomischen MR-Wirkung mit anderen zellulären Signalwegen wurde postuliert und im Falle der Adrenorezeptoren auch nachgewiesen⁴⁶.

Die Ergebnisse von Dr. M. Kellner sollten mit physiologischen Aldosteron-Konzentrationen im Real-time PCR Verfahren bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde die

Quantifizierung von mRNA mittels Real-time PCR mit dem Light Cycler System (Roche) etabliert. Insgesamt zeigte sich bei diesen Arbeiten jedoch, dass die Ergebnisse der Aldosteron-induzierten Geninduktion in verschiedenen DTEC-Isolaten weit variabler waren, als die ersten Versuche dies erkennen ließen. Obwohl die als Kontrolle eingesetzte Induktion von *Sgk1* durch Dexamethason sehr gut reproduzierbar war, konnte in der Real-time-PCR entgegen den Vorversuchen mit konventioneller PCR keine Regulation von RGS3, GDI2, GRK5 oder ARL7 durch Aldosteron beobachtet werden.

An den DTEC Isolaten wurden zudem funktionelle Tests durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich Aldosteron-induzierte Veränderungen der zellulären Eigenschaften nachweisen lassen. Hierfür wurde die Wirkung von Aldosteron auf G-Protein-gekoppelte Signalwege überprüft, da mehrfach in der Literatur auf einen Crosstalk zwischen Steroidrezeptoren und GPCRs hingewiesen wurde. So fanden Massaad et al.⁴⁷ eine Aktivierung des MR durch cAMP. Interessanterweise unterschied sich die Wirkung von cAMP auf den MR von derjenigen, die cAMP auf den GR ausübt. Massaad et al. stellten fest, dass für die Aktivierung der PKA die NTD der Steroidrezeptoren verantwortlich ist. Während die Deletion der NTD des GR die Wirkung von cAMP auf diesen Rezeptor nicht veränderte, führte die Deletion der MR NTD zu einer Aufhebung des PKA-Effekts auf den MR. Möglicherweise aktiviert die PKA den MR direkt durch eine Phosphorylierung der NTD. Denkbar ist aber auch eine indirekte Aktivierung über die Interaktion der NTD von Steroidrezeptoren mit spezifischen Proteinen, die über den PKA-Signalweg phosphoryliert werden. Zur Überprüfung der Wirkung von Aldosteron auf G-Protein-gekoppelte Signalwege wurden DTEC Zellen nach einer Vorinkubation mit Aldosteron einer Stimulation mit Dopamin, Isoprenalin, Vasopressin, Calcitonin oder PTH unterzogen. Hierbei ließ sich nach einer Stimulationszeit von 4 Stunden eine signifikante Verstärkung der Dopamin-induzierten cAMP-Produktion durch Aldosteron sowie eine signifikante Verringerung der PTH vermittelten Synthese von cAMP nachweisen.

Die mögliche Wirkung der ausgewählten Gene auf Zellproliferation und Proteinsyntheserate (als Surrogatparameter für Hypertrophie) wurde durch den Einbau von ³H-Thymidin (Proliferation) bzw. ³H-Leucin (Proteinsynthese) bestimmt. Hierfür mussten RGS3, GDI2, GRK5 und ARL7 zunächst transient oder stabil in Nierenzellen transfiziert werden. Die Transformation der primären DTECs erschien jedoch aufgrund ihrer sehr begrenzten Verfügbarkeit und ihrer schnellen Transdifferenzierung in Kultur sehr ungünstig. Daher wurden die Versuche zunächst unter Verwendung einer Zelllinie etabliert. Als Modellsystem wurde M1, eine immortalisierte Sammelrohr-Zelllinie der Maus, ausgewählt. Die vier beschriebenen Gene wurden zum Teil aus IMAGE Klonen, zum Teil von anderen Arbeitsgruppen erhalten und in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo subkloniert. Da M1 sehr schlechte Transformierbarkeit zeigt, mussten stabile Klone entwickelt werden. Deren Verwendung wirft jedoch zusätzliche Probleme

auf, da die stabile Transformation zu nicht vorhersagbaren, sekundären Effekten durch die (zufällige) Integration in das Wirtsgenom führen kann. Deshalb wurden immer mehrere unabhängige Klone parallel funktionell untersucht.

Von den untersuchten Genen zeigte RGS3 eine Verringerung der Proteinsynthese im Vergleich zu Klonen, die nur mit dem leeren Vektor transformiert waren. Aufgrund der großen Standardabweichung waren die Ergebnisse nicht signifikant. Bei keinem der anderen Gene konnte ein Einfluss auf Proliferation/Proteinsynthese festgestellt werden ($p < 0,05$).

Als wichtige, weil direkt mit der physiologischen Funktion korrelierbare Parameter, wurden elektrophysiologische Messungen der Ionenströme ausgewählt. In Zusammenarbeit mit Prof. H. Mairböurl, Heidelberg, wurde die Ussing-Kammer Methode im Institut etabliert. Obwohl die primären DTECs FITC-Dextran undurchlässige Zellschichten ausbilden, entwickelten sie in mehreren Versuchsreihen keine elektrisch dichten Zellschichten und waren daher nicht für elektrophysiologische Untersuchungen zugänglich. Die als Modellsystem ausgewählten M1 Zellen hingegen wuchsen zu gut messbaren Präparationen heran. Die mit diesen Zellen in der Literatur angegebenen funktionellen Befunde konnten reproduziert werden.

Permanente Zellkulturen wie M1-Zellen werden entweder aus Tumorzellen oder durch Immortalisierung „normaler“ Zellen gewonnen. Diese haben zum einen den Vorteil, dass sie lange in Kultur gehalten werden können und zum anderen über einheitliche physiologische Merkmale verfügen, die sich im Allgemeinen auch über viele Passagen hinweg nicht verändern. Allerdings sind in Zelllinien hierdurch viele ursprüngliche Zellparameter im Gegensatz zu primären Kulturen verändert.

Primäre Zellkulturen werden hingegen direkt aus dem isolierten Organ gewonnen und weisen dessen ursprüngliche Eigenschaften auf, so dass Ergebnisse mit primären Zellen aussagekräftiger sind, weil sie viel stärker mit dem physiologischen System korrelierbar sind. Deshalb wurden primäre humane distal tubuläre Epithelzellen (DTECs) ausgewählt, da Nierenzellen aus dem distalen Tubulus ein klassisches Zielorgan für Aldosteron darstellen.

Die Verwendung von Primärzellen bringt andererseits, wie aus diesen Ergebnissen ersichtlich, einige Probleme mit sich. Als primäre humane Zellen können sie aus ethischen Gründen ausschließlich bei der Sektion erkrankter Organe gewonnen werden. DTECs werden zwar aus den morphologisch gesunden Teilen chirurgisch resezierter Nieren gewonnen. Im Grunde handelt es sich bei diesen Präparaten jedoch um Zellen, die aus kranken bzw. geschädigten Nieren erhalten werden. Da uns die Zellen von Dr. P. Baer (Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurden und die Spender anonymisiert waren, war über genaue Erkrankungen der Spender bzw. über sonstige Begleitkrankheiten nichts bekannt. Ein Einfluss der Grundkrankheit auf die Funktion

dieser Zellen ist daher nicht auszuschließen. Dies hat zur Folge, dass sich einzelne Isolate erheblich voneinander unterscheiden können.

Der ursprüngliche Microarray, welchem zufolge RGS3, GRK5, GDI2 und ARL7 durch Aldosteron reguliert worden waren, war nur mit einem Isolat DTEC-Zellen durchgeführt worden. Die Expression dieser Gene wurde anschließend in Vorversuchen mit wenigen Isolaten mittels konventioneller PCR überprüft. Bei Ausdehnung des Versuches auf eine größere Zahl von Isolaten und Bedingungen stellte sich jedoch heraus, dass sich die einzelnen Isolate teilweise sehr voneinander unterschieden. So konnten bereits bei der Kultivierung morphologische Unterschiede verschiedener Zellisolate festgestellt werden. Ferner hefteten die Zellen einiger Präparationen nach dem Auftauen sehr gut auf der Oberfläche der Kulturflaschen an und konnten über 6 bis 7 Passagen subkultiviert werden, wohingegen die Zellen anderer Präparationen trotz Beschichtung schlecht oder gar nicht an die Zellkulturflaschen adhärirten und andere schon nach nur zwei oder drei Passagen plötzlich in Apoptose übergingen.

Diese Variabilität im Verhalten der einzelnen Zellisolate ist eine mögliche Erklärung für die nicht reproduzierbare Induktion durch Aldosteron bzw. Dexamethason. Die weitere Verwendung der DTEC-Isolate erwies sich hierdurch als problematisch.

4.2 Nähere Charakterisierung des Mineralocorticoid-Rezeptors und Identifizierung interagierender Proteine

Mineralocorticoid- und Glucocorticoid-Rezeptor werden in vielen Geweben, in denen sie unterschiedliche physiologische Wirkungen aufweisen, koexprimiert. Da der MR Glucocorticoide mit einer 10-fach höheren Affinität im Vergleich zu Aldosteron bindet, wird er in epithelialen Geweben durch das Enzym 11 β -HSD2, welches aktives Cortisol in inaktives Cortison überführt, vor einer Überflutung mit Glucocorticoiden geschützt^{27,81} (vgl. Kap. 1.3). In Geweben, in denen der MR dagegen nicht zusammen mit 11 β -HSD2 exprimiert wird, müssen differentielle Effekte von Cortisol und Aldosteron durch andere Mechanismen hervorgerufen werden. Aber auch in epithelialen Geweben kann eine Spezifität von MR und GR nicht ausschließlich über das Enzym 11 β -HSD2 erklärt werden, da dieses die Cortisol-Konzentration global in der Targetzelle reduziert, jedoch nicht MR und GR modulieren kann.

Für die Spezifität des MR könnte weiterhin die Kinetik der MR-Liganden-Interaktion eine Rolle spielen. Die Aldosteron-Bindung stabilisiert den Rezeptor in seiner aktiven Konformation, während Cortisol schneller vom Rezeptor dissoziiert und den Rezeptor weniger effizient in seiner aktiven Form stabilisiert (siehe Abbildung 36)¹⁹. Aber auch dieser Mechanismus kann nicht ausschließlich die Spezifität des MR erklären. Hierfür müssen zusätzliche weitere Faktoren verantwortlich sein, was die Frage nach dem Einfluss einer Interaktion des Rezeptors mit Liganden-spezifischen Koregulatoren aufwirft.

Bedingt durch die Ähnlichkeit der beiden Rezeptoren in ihrer DNA-bindenden Domäne weisen sie identische DNA-Bindungsspezifitäten auf. GR und MR binden an die DNA an sogenannte *hormone response elements* (HRE) in der Promotorregion des Targetgens, die für GR und MR sehr ähnlich, evtl. sogar identisch sind. Nachdem der Hormon-Rezeptor-Komplex an die DNA gebunden hat, erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors. Die Liganden Cortisol und Aldosteron, die beide am MR angreifen können, induzieren unterschiedliche Konformationen der MR LBD, die zur Rekrutierung unterschiedlicher Kofaktoren führen^{22,82}.

Untersuchungen am Estrogen- und Glucocorticoidrezeptor haben bereits gezeigt, dass Kofaktoren eine wichtige Rolle für die Wirkung von Steroiden spielen.

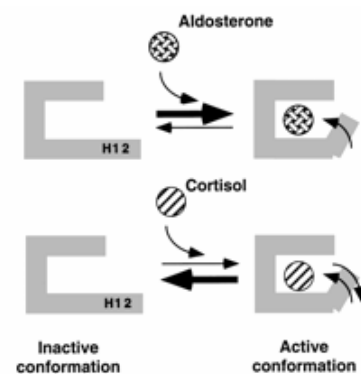


Abbildung 36 Modell der Bindung von Aldosteron und Cortisol am MR¹⁹

Während die differentielle Rekrutierung von Kofaktoren für die meisten Steroidrezeptoren relativ gut untersucht ist, ist beim Mineralocorticoid-Rezeptor hierüber bisher wenig bekannt. Dies liegt vor allem an der schwierigen Handhabung des MR. Im Vergleich zu anderen Steroidrezeptoren weist der MR die niedrigste Expression (Proteinmenge) und die geringste funktionelle Stabilität auf^{83,84}. Zum anderen steht gegenwärtig kein ausreichend guter Antikörper für eine Immunpräzipitation zur Verfügung, was eine entscheidende Voraussetzung für die Untersuchung von Proteinkomplexen ist. Dies erschwert die Arbeit mit dem MR und macht ihn nur schwer für Interaktionsstudien zugänglich.

Einige mit dem MR interagierende Kofaktoren sind bereits beschrieben worden, es wurden jedoch kaum systematische Studien durchgeführt. Untersuchungen zu Interaktionspartnern des MR wurden im Allgemeinen auf Grundlage des Hefe two-hybrid Systems durchgeführt. Während für die meisten nukleären Rezeptoren eine beachtliche Zahl an wechselwirkenden Proteinen identifiziert werden konnte, wurden nur wenige für den MR identifiziert^{85,86}.

Der Ansatz, Protein-Protein-Interaktionen mittels des Hefe two-hybrid Systems zu ermitteln, ist vor allem aus zwei Gründen zu überdenken. Zum einen ist mit dieser Methode ein sehr hoher prozentualer Anteil falsch-positiver Ergebnisse verbunden. Noch entscheidender ist aber die Frage, ob aufgrund der multimeren Struktur der Steroidrezeptor-Komplexe und der erheblichen phylogenetischen Unterschiede zwischen der Hefe und Säugetierzellen alle Wechselwirkungen abgebildet werden können. Eventuell können auch aufgrund in Hefe fehlender Komplexbestandteile nicht alle Interaktionspartner erfasst werden. Deshalb sollten Protein-Protein-Wechselwirkungen für den MR nach Expression in Säuger-Zellen auf Basis von Immunpräzipitation und Affinitätschromatographie ermittelt werden.

Um das Problem fehlender, allgemein zugänglicher Antikörper für eine Immunpräzipitation zu umgehen, hat sich in den letzten Jahren zur Aufreinigung von Proteinen immer stärker der Einsatz von so genannten Affinitäts-Tags durchgesetzt. Hierfür wird eine spezifische Peptidsequenz N- oder C-terminal an das Protein gebunden. Das Fusionsprotein kann anschließend mit Hilfe von Antikörpern gegen den jeweiligen Tag isoliert werden.

Inzwischen steht eine große Anzahl unterschiedlichster Tags zur Verfügung. Um den Einfluss des zur Aufreinigung verwendeten Affinitäts-Tag möglichst gering zu halten, wurden kurze Tags ausgewählt, die zudem eine hohe Spezifität zum jeweiligen Bindungspartner aufweisen. Zudem kann man durch die Verwendung kurzer Peptidsequenzen vermeiden, dass der Tag später entfernt werden muss. Dennoch ist der Einfluss eines Tags auf ein Fusionsprotein nicht vorhersagbar. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb parallel mehrere Tags an den MR fusioniert.

Neben dem *Biotin*- und *Flag-Tag*, wurde außerdem ein Fusionskonstrukt mit einem *Streptavidin-Tag* hergestellt. Alle Tags wurden zunächst N-terminal an den MR fusioniert. Zudem stand ein EGFP-MR-Fusionskonstrukt zur Verfügung, das uns freundlicherweise von Dr. M. Lombès (Faculté de Médecine, Paris-Sud) überlassen wurde. Für anschließende Versuche im Großmaßstab sollte für das System, das bei einer Immunpräzipitation die höchsten Ausbeuten lieferte, zusätzlich ein C-terminal mit einer Affinitätssequenz fusioniertes Konstrukt hergestellt werden. Die Fusion einer Affinitätssequenz kann prinzipiell die Funktion des Proteins beeinflussen. Durch die Verwendung von C- und N-terminal modifizierten Konstrukten kann bei Identifizierung interagierender Proteine mit beiden Konstrukten ein eventueller Einfluss der Affinitätssequenz weitgehend ausgeschlossen werden.

In den klonierten Fusionskonstrukten wurde die korrekte Sequenz von Tag und Mineralocorticoid-Rezeptor durch Sequenzierung überprüft und nachfolgend durch Überexpression in HEK293T Zellen und anschließendem Immunoblot nachgewiesen.

Den kritischen Punkt für jedes Fusionskonstrukt stellt jedoch seine Funktionsfähigkeit dar. Um diese zu überprüfen, wurden mit allen MR-Fusionsproteinen Transaktivierungsassays durchgeführt. Hierfür wurden ein Reporterogen (Luciferase), welches unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors (MMTV) steht, sowie ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen (Galaktosidase) zusammen mit dem Fusionsprotein in HEK293T-Zellen koexprimiert. Die Messergebnisse aus dem Luciferase-Assay wurden mit den Daten der Galaktosidase-Messung normiert.

Die Induktion des Reportergens wurde nach Stimulation mit Aldosteron (1nM) im Vergleich zur Ethanol-Kontrolle überprüft. Um eine Beteiligung des Glucocorticoid-Rezeptors völlig ausschließen zu können -obwohl dies bei Aldosteron-Konzentrationen von 1nM sehr unwahrscheinlich ist- wurde in parallelen Ansätzen zusätzlich zu Aldosteron der Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonist RU486 eingesetzt.

4.2.1 Biotin-Tag-rMR

Unter den auf Affinität basierenden Aufreinigungssystemen spielt das Avidin/Biotin-System eine große Rolle. Die Bindung zwischen Biotin und Avidin ist die stärkste, natürlich vorkommende nicht-kovalente Bindung ($K_d = 10^{-15}M$) – erheblich stärker als die Bindung vieler häufig verwendeter Antikörper oder Affinitätstags. Die hohe Bindungskapazität von Biotin an Avidin oder Streptavidin ermöglicht die Aufreinigung biotinylierter Proteine unter stringenten Bedingungen. Nur wenige eukaryotische Proteine liegen in ihrem natürlichen Zustand biotinyliert vor. Dies reduziert mögliche Kreuzreaktionen, wenn Proteine über eine Biotinylierung aufgereinigt werden sollen. Die Biotinylierung erfolgt über eine exogene Biotin-Ligase, die bakterielle BirA-Ligase. Ein kleiner Peptid-Tag von 15AS wird vor das Protein kloniert und zusammen mit der BirA-

Ligase in Säugerzellen überexprimiert. Der Tag wird durch die eingebrachte Ligase spezifisch *in vivo* biotinyliert und kann im Anschluss durch Bindung an Streptavidin isoliert werden, da endogene Säuger-Proteine nicht durch BirA modifiziert werden⁸⁷ und Bakterien nur ein natürliches Substrat aufweisen⁸⁸.

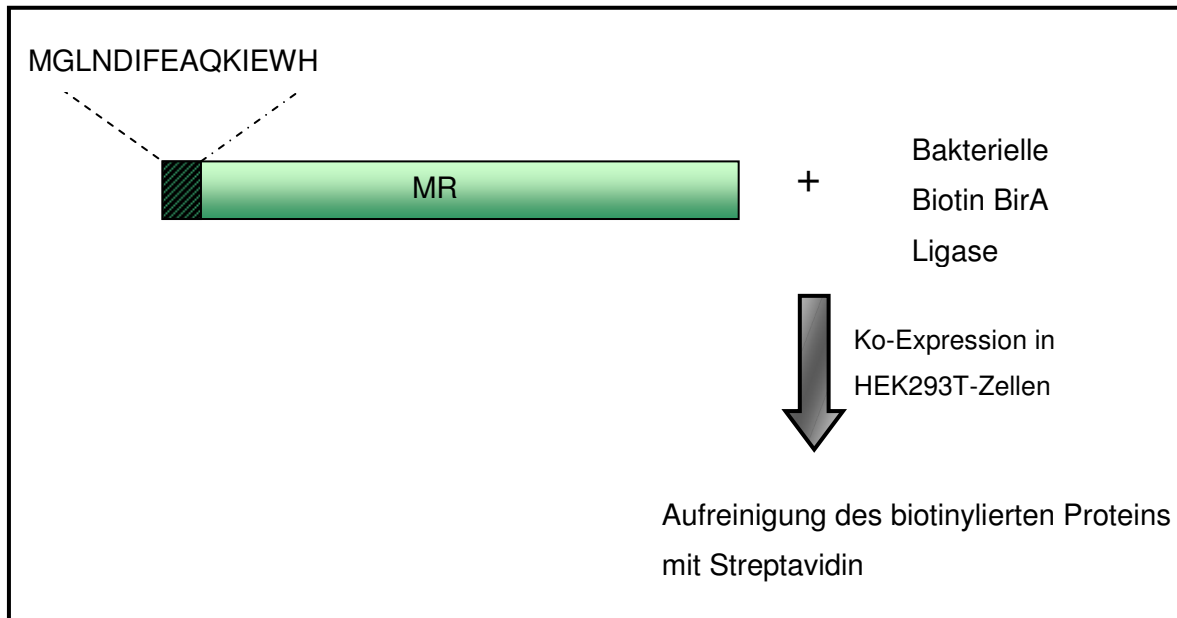


Abbildung 37 Prinzip des Biotin-Tag-Systems

Zunächst wurde die kodierende Sequenz des Mineralocorticoid-Rezeptors in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert. Danach erfolgte die Expression in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T-Zellen). Die sich daran anschließende Proteinaufreinigung des mit einem Affinitäts-Tag versehenen Fusionsproteins wurde mit dem Gesamtproteinextrakt dieser Zellen durchgeführt.

4.2.1.1 Klonierung

Der Ratten-Mineralocorticoid-Rezeptor wurde per PCR mit Pfu-Turbo[®]-Polymerase (s. 3.2.2.3.1) aus dem Ursprungsvektor pCMV4neo-ratMR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass das PCR-Produkt am 5`-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NheI und am 3`-Ende für NotI aufwies (Primer *MR sense Not* und *MR antisense Kpn* s. Tabelle 5). Es wurden 25 PCR-Zyklen durchgeführt, die Annealing-Temperatur betrug 50°C.

Zur Herstellung der Biotin-Tag-Kassette wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert (Firma MWG), die für die Aminosäuresequenz *MGLNDIFEAQKIEWH* kodieren und am 5`Ende eine NheI-, am 3`Ende eine Schnittstelle für NotI aufwiesen (*Biotin Tag sense NheNot* und *Biotin Tag antisense NotNhe* siehe Tabelle 5). Die beiden Oligonukleotide wurden 10 Minuten bei 85°C inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur um 1°C pro Minute bis auf Raumtemperatur gesenkt.

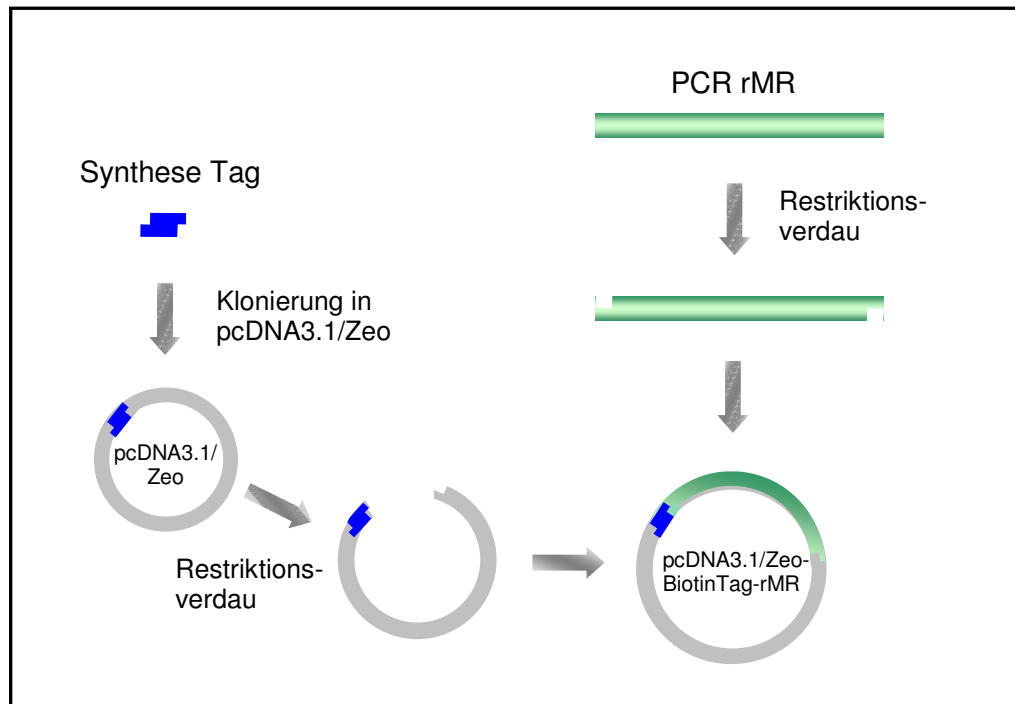


Abbildung 38 Klonierungsstrategie für den Biotin-Tag-Mineralocorticoid-Rezeptor

Die so hergestellte Kassetten wurde phosphoryliert (siehe 3.2.2.11), in den mit NheI und NotI geschnittenen, dephosphorylierten (s. 3.2.2.10) Vektor pcDNA3.1/Zeo(-) ligiert (siehe 3.2.2.12) und anschließend in XL1blue-Zellen transformiert (siehe 3.2.2.12.1). Zur Analyse der klonierten DNA-Konstrukte wurden zunächst Minipräparationen hergestellt. Durch Kontrollverdau wurden mehrere Klone ermittelt, die den mit dem Tag versehenen Vektor aufgenommen hatten.

Im nächsten Schritt wurden der mit einer Affinitätssequenz versehene Vektor und das MR-Amplifikat mit den Restriktionsenzymen NotI und KpnI geschnitten. Der Vektor wurde dephosphoryliert und anschließend das geschnittene PCR-Produkt in den Vektor ligiert. Nach Transformation in XL1blue-Zellen und der Minipräparation von Plasmid-DNA erfolgte eine Überprüfung der richtigen Sequenz durch Kontrollverdau. Obwohl eine Proofreading-Polymerase zur Amplifizierung des rMR verwendet wurde, wurden bei einer anschließenden Sequenzierung drei Fehler in der kodierenden Sequenz ermittelt. Bei Base 1933 war Adenin gegen Glycin ausgetauscht. Für die Basen 2785/2786 ergab die Sequenzierung die Basen Guanin und Cytosin anstelle von Cytosin und Guanin. Die Base 3214 Guanin war laut Sequenzierung gegen Cytosin ausgetauscht. Da es sich bei keiner dieser Mutationen um eine stille Mutation handelte, wurde zur gezielten Veränderung der DNA-Sequenz eine In-vitro-Mutagenese durchgeführt (s. Kap.3.2.2.4), um die falsch eingebauten Basen zu eliminieren. Die korrekte Sequenz wurde anschließend erneut durch Sequenzierung bestätigt.

Zur Überprüfung der Expression wurde das Fusionskonstrukt in HEK293T Zellen transfiziert, konnte im Western-Blot jedoch nicht mittels Antikörpern gegen den Mineralocorticoid-Rezeptor nachgewiesen werden.

Deshalb wurde zusätzlich vor das Startcodon durch Klonierung eine Kozak-Sequenz (GCCACCATGG) eingefügt, um die Expression des MR zu verbessern. Die Biotin-Kassette ohne Kozak-Sequenz wurde aus dem Vektor pcDNA3.1/Zeo-BiotinTag-rMR ausgeschnitten und per Ligation durch die neue Kassette ersetzt (Oligonukleotide s. Tabelle 5 *Biotin Tag sense Kozak NheNot* und *Biotin Tag antisense Kozak NotNhe*).

4.2.1.2 Überprüfung der Expression

Das Fusionskonstrukt pcDNA3.1/Zeo-BiotinTag-rMR wurde zusammen mit Biotin-Ligase BirA (in pcDNA3.1/Zeo) in HEK293T-Zellen transfiziert und nach 48 Stunden geerntet. Hierfür wurden die Zellen mit PBS (4 °C) gewaschen und in 1x-Probenpuffer abgeschabt. Die Proben wurden über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die Expression wurde zum einen durch einen spezifischen Antikörper gegen den MR überprüft. Da alle kommerziell erhältlichen Antikörper gegen den Mineralocorticoid-Rezeptor weder für eine Immunpräzipitation geeignet sind, noch bei unseren Versuchen mit verschiedenen Zelllinien zufrieden stellende Ergebnisse im Western-Blot erzielten, wurden uns Antikörper gegen verschiedene Regionen des humanen Mineralocorticoid-Rezeptors von Dr. C. Gomez-Sanchez zur Verfügung gestellt⁶⁰. Von diesen sechs getesteten Antikörpern erwies sich ein Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1-18 gerichtet ist, als besonders spezifisch. Dieser Antikörper (MR1-18 6G1) lieferte gut definierte Banden im Westernblot bei einem Molekulargewicht von ~110kDa und wurde für alle weiteren Versuche verwendet. Da die Sequenz des MR 1-18 Peptids in Ratte, Mensch und Maus identisch ist, eignet sich der Antikörper für diese Spezies für eine Detektion im Western-Blot.

Des Weiteren wurde die Expression mit Antikörpern gegen den jeweiligen Tag überprüft. Im Falle des Biotin-Tag mit Streptavidin-HRP (1:5000).

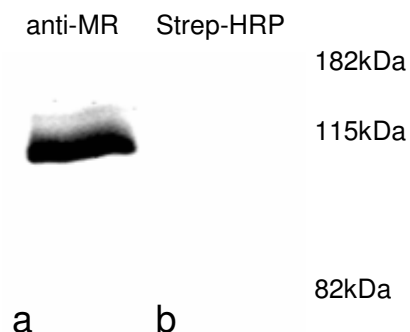


Abbildung 39 Überexpression von pcDNA3.1/Zeo-Biotin-Tag-rMR und pcDNA3.1-BirA in HEK293T Zellen. (a) Blot detektiert mit monoklonalem MR-1-18 6G1 (1:100) und Rabbit-anti-mouse-Zweitantikörper (1:2000) (b) Blot detektiert mit Streptavidin-HRP 1:5000.

Nach Ko-Expression des Biotin-Tag-rMR-Konstruktes und BirA in HEK293T-Zellen konnte zwar mit einem Antikörper gegen den MR das Fusionsprotein detektiert werden, nicht jedoch mit einem Streptavidin-Konjugat, das gegen den Tag gerichtet ist. Demzufolge wurde das Fusionskonstrukt in HEK293T-Zellen exprimiert, jedoch nicht durch BirA biotinyliert. Fehler in der Aminosäuresequenz sowohl des Biotin-Tags als auch der Biotin-Ligase BirA konnten durch Sequenzierung jedoch ausgeschlossen werden.

4.2.1.3 Funktionalität: Luciferase/Galaktosidase

Die Funktionalität des klonierten Konstruktes konnte über einen Luciferase-Assay nachgewiesen werden (Abbildung 40). Nach Stimulation mit Aldosteron war ein deutlicher Anstieg der Reportergen-Aktivität zu beobachten, der auch durch RU486 nicht hemmbar war.

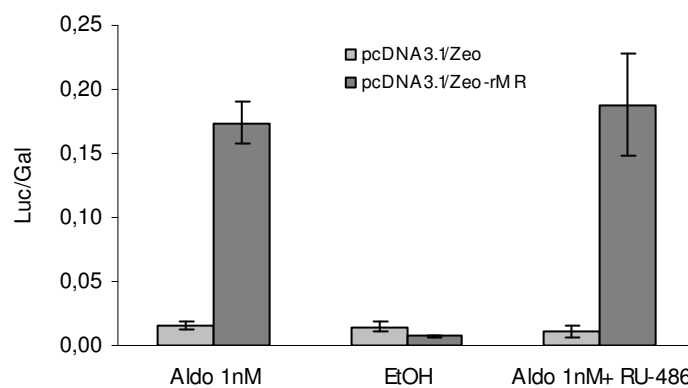


Abbildung 40 Transkriptionelle Aktivierung von Biotin-Tag MR. HEK293T Zellen wurden transient mit dem Reportergenplasmid MMTV-Luc transfiziert. Die Expressionsvektoren pcDNA3.1/Zeo bzw. pcDNA3.1/Zeo-BiotinTag-rMR wurden mit dem Reportergen MMTV-Luc und dem Referenzgen β -Gal kotransfiziert. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C mit 1nM Aldosteron mit oder ohne Zusatz von RU-486 oder mit Ethanol inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier separaten Transfektionen, von denen jede Probe im Duplikat gemessen wurde (n=8)

Obwohl das Fusionsprotein gut in HEK293T-Zellen exprimiert wurde und ebenfalls seine Funktionalität nachgewiesen werden konnte, fand jedoch keine Biotinylierung des Tags durch BirA statt. Möglicherweise wurde BirA nach Transfektion nicht ausreichend exprimiert oder die durchgeführte Kotransfektion war nicht effizient genug. Daher war es nicht möglich, den MR über dieses Fusionskonstrukt zu isolieren.

Da zeitgleich alternative Systeme entwickelt wurden, die in einer Immunpräzipitation gute Ausbeuten erzielen konnten, wurden die Experimente auf Basis des Biotin-Tag-Systems nicht fortgeführt.

4.2.2 *EGFP-hMR*

Das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) stammt aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria*. Es erhält seine Lumineszenz durch das Photoprotein Aequorin, welches Calcium bindet und daraufhin blaues Licht produziert. GFP absorbiert blaues Licht bei 395nm und emittiert grünes Licht bei 510nm.

Der Fluoreszenzmarker GFP kann in lebende Zellen eingebracht und exprimiert werden und so in Form von Fusionsproteinen dazu verwendet werden, Genexpression nachzuweisen und die intrazelluläre Lokalisation sichtbar zu machen. Mit Hilfe von GFP-Konstrukten können die Aktivität des untersuchten Gens sowie dessen Bewegungen in Zellen verfolgt werden. Dieser Tag unterscheidet sich von den übrigen ausgewählten Tags vor allem durch seine Größe (238 Aminosäuren).

Von Dr. M. Lombés (Universität Paris) wurde ein EGFP-hMR („enhanced GFP“) Fusionskonstrukt (pEGFP-C1-hMR) zur Verfügung gestellt, mit dem nachfolgende Untersuchungen durchgeführt wurden.

4.2.2.1 *Überexpression von pEGFP-MR und Immunpräzipitation*

48 Stunden nach der Transfektion des Fusionsplasmides pEGFP-hMR in HEK293T-Zellen wurden die Zellen in 1x-Probenpuffer geerntet. Die Proben wurden über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die Expression wurde sowohl durch einen spezifischen Antikörper gegen den MR (anti-MR, 1-18 6G1, 1:100) als auch mit anti-GFP (1:1000) überprüft.

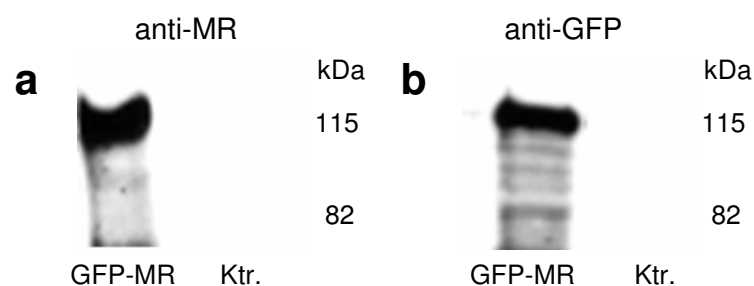


Abbildung 41 Überexpression von EGFP-hMR in HEK293T-Zellen (a) Blot detektiert mit anti-MR 1-18 6G1 (1:100) und Rabbit-anti-mouse-HRP (1:2000) (b) Blot detektiert mit anti-GFP (1:1000) und Rabbit-anti-mouse (1:3000). Als Kontrolle wurde HEK293T-Gesamtzelllysat von nicht-transfizierten Zellen aufgetragen.

Für die Immunpräzipitation von EGFP-MR wurde das Fusionskonstrukt mit FuGene 6 in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und mit anti-GFP Antikörper, wie in Kap. 3.2.3.6.1 beschrieben, präzipitiert. Es konnte allerdings nur etwa ein Viertel des überexprimierten Mineralocorticoid-Rezeptors mit dieser Methode isoliert werden (s. Abbildung 42).

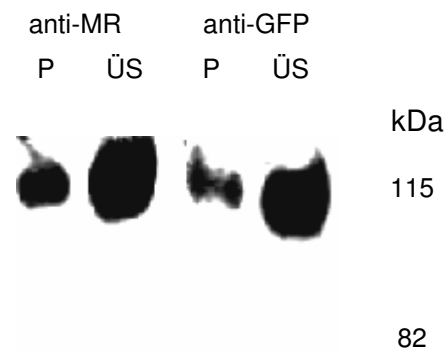


Abbildung 42 Immunpräzipitation von EGFP-hMR mit anti-GFP-Antikörper. Blot detektiert mit anti-MR 1-18 6G1 (1:100) Erstantikörper und Rabbit-anti-mouse (1:2000) Zweitantikörper sowie anti-GFP (1:1000) und Rabbit-anti-mouse (1:3000). *P* immunpräzipitierter MR *ÜS* nicht-präzipitierter MR im Überstand

Eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen den Tag lieferte keine ausreichende Menge an Präzipitat, so dass zur Isolierung des MR ein anderes System verwendet wurde.

4.2.2.2 Funktionalität: Luciferase/Galaktosidase

Um die Funktionalität des mit EGFP-fusionierten Mineralocorticoid-Rezeptors zu überprüfen, wurde auch für dieses Konstrukt ein Luciferase-Reporter-Assay durchgeführt. Abbildung 43 stellt die Ergebnisse des Luciferase-Assays normiert auf die Galaktosidase-Werte dar. Die sehr deutliche Aktivierung durch Aldosteron zeigt, dass das Fusionsprotein seine Funktionalität beibehalten hat. Der Effekt ist ausschließlich auf die Bindung von Aldosteron am Mineralocorticoid-Rezeptor und nicht am Glucocorticoid-Rezeptor zurückzuführen, da zum einen bereits die niedrige Konzentration von 1nM ausreicht, um eine solche Aktivierung zu erreichen; zum anderen bleibt der Effekt unbeeinflusst von der Zugabe von RU-486.

Da das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) bekanntermaßen per se Effekte auf Zellen ausüben kann, wurde ein Parallelversuch mit dem leeren pEGFP-Vektor durchgeführt. Für diesen Vektor war im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle jedoch keine Zunahme der Promotoraktivität zu beobachten.

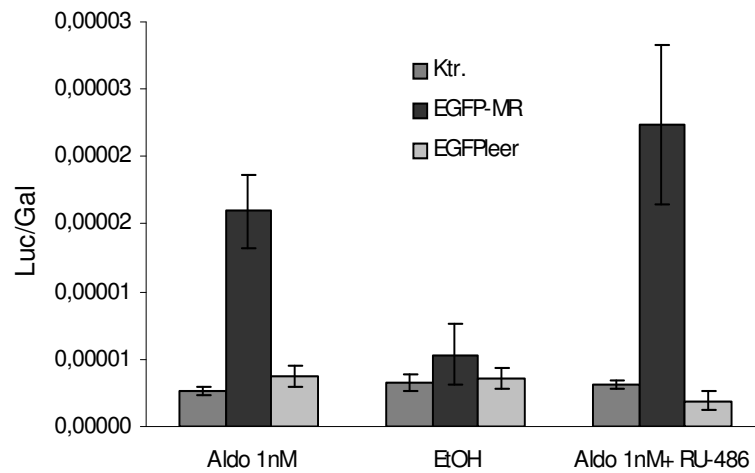


Abbildung 43 Transaktivierung von EGFP-MR nach Stimulation mit Aldosteron. Die dargestellten Werte sind normiert auf β -Galaktosidase. Es ist der Mittelwert aus acht separaten Transfektionen dargestellt. Jede Transfektion wurde jeweils als Doppelwert gemessen (n=16).

4.2.3 *Flag-Tag-MR*

4.2.3.1 *Klonierung pcDNA3.1/Zeo-FlagTag-rMR*

Der Ratten-Mineralocorticoid-Rezeptor wurde via PCR mit Pfu-Turbo[®]-Polymerase amplifiziert und über die Restriktionsenzyme NheI und ApaI in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(-) ligiert. Die Flag-Kassette wurde so synthetisiert, dass sie am 5' bzw. 3' Ende Schnittstellen für NheI und NotI aufwies und wurde in den dementsprechend geschnittenen Vektor pcDNA3.1/Zeo-rMR ligiert.

Zur Herstellung der Flag-Tag-Kassette wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert (*FlagTag sense NheNot* und *FlagTag antisense NotNhe* siehe Tabelle 5), die für die Aminosäuresequenz *DYKDDDDK* (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) kodieren und am 5'-Ende eine NheI-, am 3'-Ende eine Schnittstelle für NotI aufweisen. Die beiden Oligonukleotide wurden 10 Minuten bei 85°C inkubiert und anschließend 1°C pro Minute bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde die Kassette phosphoryliert (siehe 3.2.2.11) und in den mit NheI und NotI geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pcDNA3.1/Zeo-rMR kloniert (siehe 3.2.2.12). Der Ligationsansatz wurde in XL1blue-Zellen transformiert (siehe 3.2.2.12.1) und auf LB-Ampicillin-Agarplatten selektioniert. Zur Analyse der klonierten Konstrukte wurden Minipräparationen hergestellt und einem Kontrollverdau unterzogen. Die korrekte DNA-Sequenz wurde zusätzlich durch Sequenzierung bestätigt (Fa. MWG).

4.2.3.2 *Expression*

Der mit dem FLAG-Tag fusionierte Mineralocorticoid-Rezeptor wurde in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und über ein SDS-Gel, Western-Blot und anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen den MR (anti-MR, 1-18 6G1, 1:100) sowie gegen den Flag-Tag bestätigt (anti-Flag-M2, 1:1000). Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen.

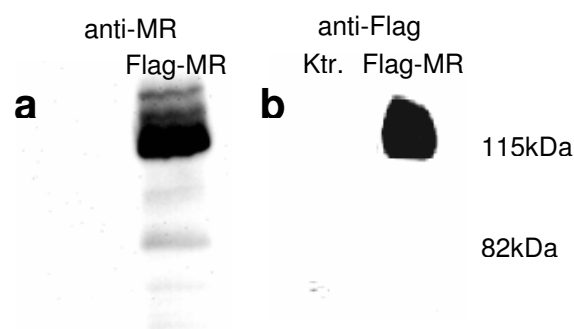


Abbildung 44 Expression FLAG-tag-Mineralocorticoid-Rezeptor. (a) Blot detektiert mit monoklonalem MR-Antikörper (1:100) und Rabbit-anti-mouse Zweitantikörper (1:2000) (b) Blot detektiert mit anti-Flag-M2-Erstantikörper (1:1000) und Rabbit-anti-mouse Sekundärantikörper (1:5000)

4.2.3.3 Funktionalität: Luciferase/Galaktosidase

Die Funktionalität des klonierten Flag-Tag-MR-Konstruktes konnte ebenfalls über einen Transaktivierungsassay erwiesen werden. Die Durchführung erfolgte analog zu den oben beschriebenen Biotin- und GFP-Tag fusionierten Konstrukten.

Die Zellen wurden mit 1nM Aldosteron, 1nM Aldosteron plus 1 μ M RU486 sowie als Negativkontrolle nur mit Ethanol stimuliert. Es wurden jeweils vier separate Transfektionen durchgeführt, von denen jede Probe doppelt gemessen wurde (n=8). Die Ergebnisse dieses Transaktivierungsassays sind in Abbildung 45 zusammengefasst.

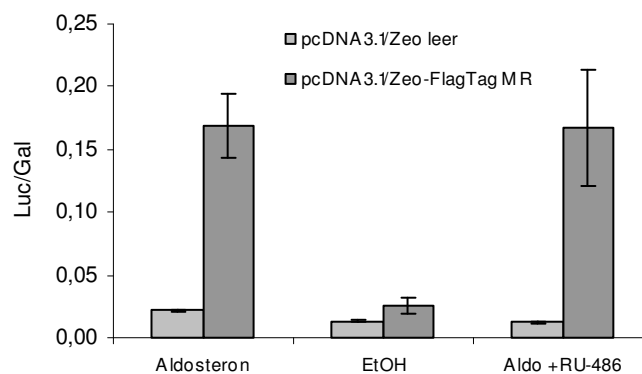


Abbildung 45 Transkriptionelle Aktivierung von Flag-Tag MR. HEK293T Zellen wurden transient mit dem Reporterplasmid MMTV-Luc transfiziert. Die Expressionsvektoren pcDNA3.1/Zeo und pcDNA3.1/Zeo-FlagTag-hMR wurden kotransfiziert. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C mit 1nM Aldosteron mit oder ohne Zusatz von 1 μ M RU-486 oder mit Ethanol inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier separaten Transfektionen, von denen jede Probe im Duplikat gemessen wurde (n=8). *Aldo* Aldosteron

4.2.3.4 Isolierung von Flag-Tag-MR

Bei einer Immunpräzipitation mit anti-Flag-M2 Affinity Gel (s. Kap. 3.2.3.6.1) konnten maximal 50% des überexprimierten getaggten Proteins präzipitiert werden. Die Ausbeute war daher zu gering, um hierbei interagierende Proteine zu isolieren. Daher wurde für die Isolierung des MR-Proteinkomplexes ein alternatives Fusionstag-System verwendet.

4.2.4 *STrEP[®]-Tag MR*

Das hier verwendete One-Strep-Kit (IBA BioTAGnology) basiert auf dem so genannten One-Strep-Tag[®], einer weiterentwickelten Variante des Strep-Tag[®] II. Das Oktapeptid Strep-TagII (WSHPQFEK) kann sowohl N- als auch C-terminal mit einem zu exprimierenden Protein fusioniert werden. Die Grundlage für dieses System stellt das Biotin-Avidin-System dar. Der Strep-Tag bindet in der Biotin-Bindetasche von Streptavidin. Es wurde eine Streptavidinvariante, das so genannte Strep-Tactin⁸⁹ entwickelt, die eine deutlich bessere Affinität gegenüber dem Strep-Tag aufweist. Da Biotin jedoch eine viel größere Bindungs-Affinität zum Strep-Tag als Strep-Tactin selbst besitzt, kann Biotin zur Elution des gewünschten Proteins verwendet werden⁹⁰.

Es erfolgte zunächst eine N-terminale Fusion von Strep-Tag und Mineralocorticoid-Rezeptor. Nach Überprüfung von Funktionalität und Expression wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt, in welcher der MR mit zufrieden stellenden Ausbeuten isoliert werden konnte. Da dieses System im Vergleich zu den anderen Affinitätssystemen die höchsten Ausbeuten lieferte, wurde der MR zusätzlich C-terminal mit dem Strep-Tag fusioniert. Dieses Konstrukt diente neben dem als Kontrolle eingesetzten leeren Vektor als weitere Kontrollmöglichkeit für die identifizierten interagierenden Proteine.

4.2.4.1 Klonierung

Die Klonierung des humanen Mineralocorticoid-Rezeptors mit einem Streptavidin-Tag erfolgte auf Basis des One-STrEP[®]-Kit der Firma IBA BioTAGnology, Göttingen.

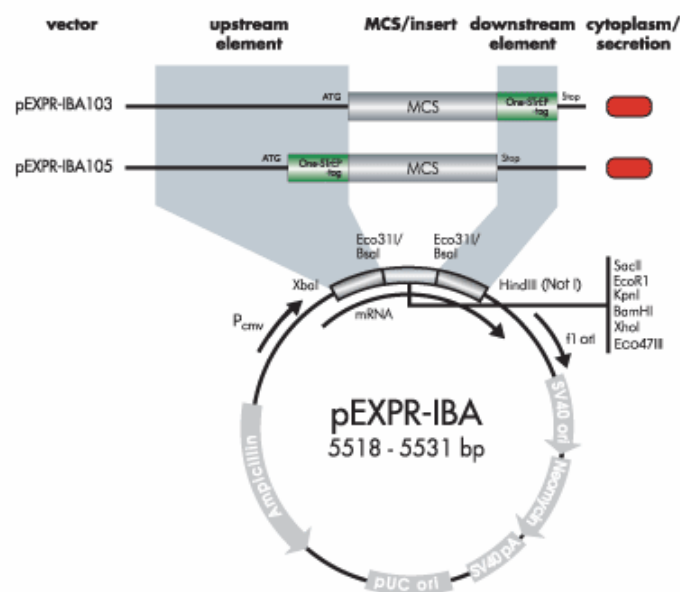


Abbildung 46 Expressionsvektoren pEXPR-IBA 103 (Tag C-terminal) bzw. pEXPR-IBA 105 (Tag N-terminal) (IBABioTAGnology, Göttingen)

Dieses System steht unter der transkriptionellen Kontrolle des humanen Cytomegalievirus (CMV)-Promotors, der eine starke Expression in einer Vielzahl von Zellen ermöglicht. Die Expressionsvektoren pEXPR-IBA 103 und 105 ermöglichen sowohl eine N- als auch eine C-terminale Fusion des *bait*-Proteins.

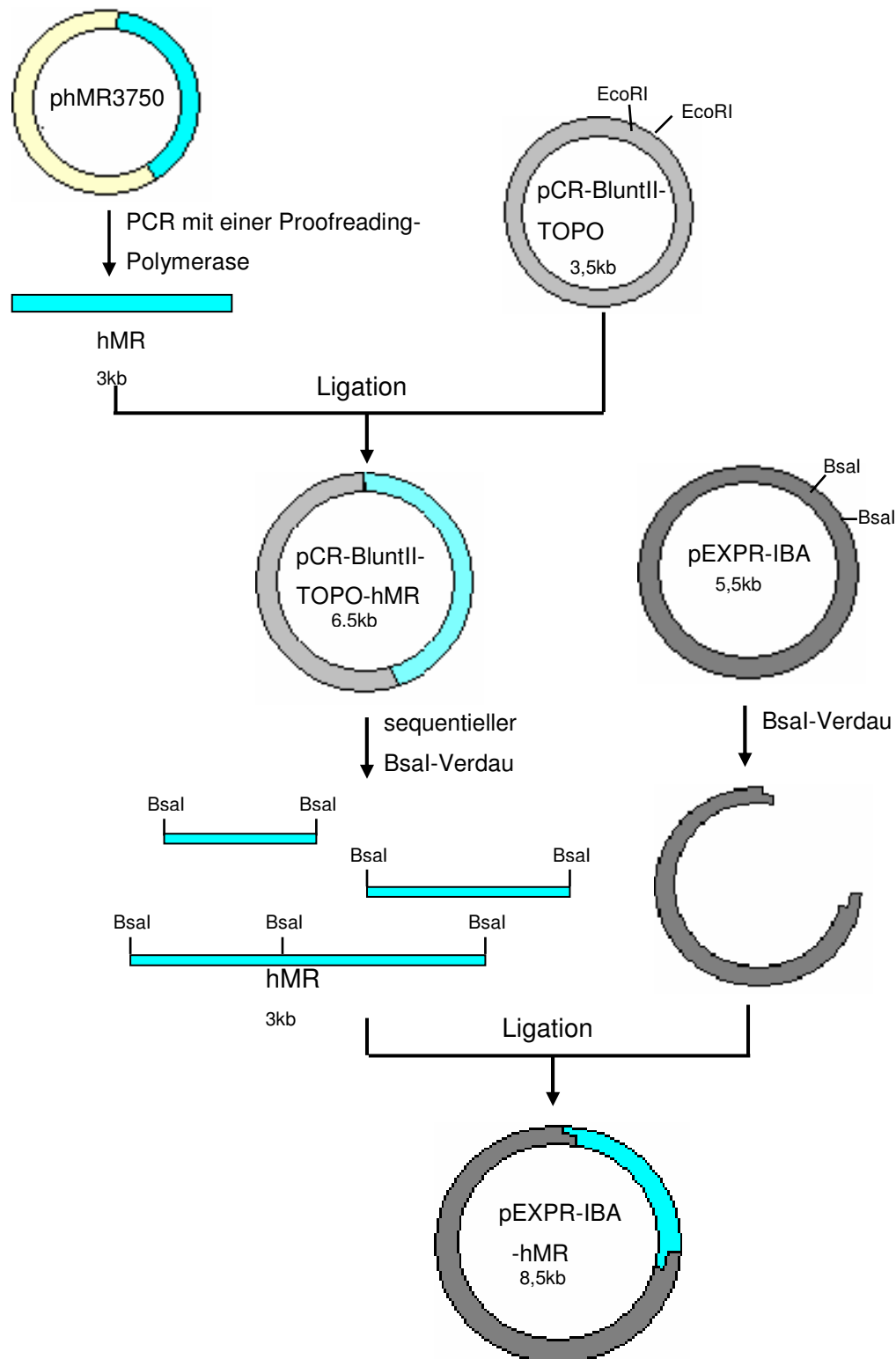


Abbildung 47 Klonierung von hMR in den pEXPR-IBA Expressionsvektor

Die Klonierung des zu untersuchenden Gens in das Expressionsplasmid pEXPR-IBA-105 erfolgte über das *TypIIS*-Restriktionsenzym *BsaI*. *TypIIS* Restriktionsenzyme schneiden die DNA außerhalb der Erkennungssequenz⁹¹.

Die PCR des humanen Mineralocorticoid-Rezeptors wurde wie in Kap. 3.2.2.3 beschrieben mit *Pfu*[®]-Ultra-Polymerase durchgeführt (Primer *hMR IBA for/rev* s. Tabelle 5). Die Annealing-Temperatur wurde bei 60°C gewählt. Die Zyklenzahl musste bei der PCR-Reaktion niedrig gehalten werden (20 Zyklen), um das Risiko von Sequenzfehlern zu verringern. Die Primer wurden so ausgewählt, dass das PCR-Produkt sowohl am 5`- als auch am 3`-Ende Erkennungsstellen für *BsaI* aufwies.

Für eine N-terminale Fusion wurde das Startcodon deletiert, da der Vektor pEXPR-IBA105 vor dem One-StrEP[®]-tag bereits ein Startcodon besitzt. Bei der C-terminalen Fusion wurde hingegen das Stopcodon eliminiert, um die korrekte Ablesung des MR zu ermöglichen.

Der humane Mineralocorticoid-Rezeptor besitzt per se zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym *BsaI* (siehe Abbildung 48).

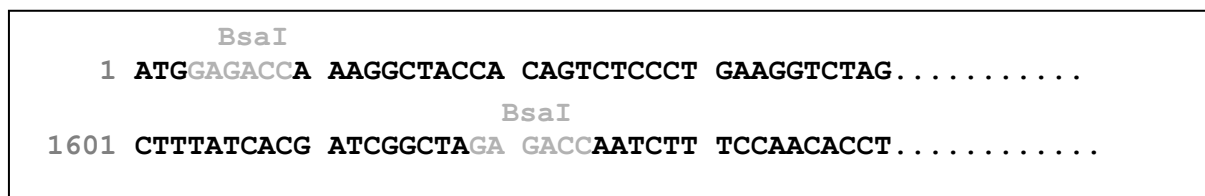


Abbildung 48 *BsaI*-Schnittstellen in der Aminosäuresequenz des humanen Mineralocorticoid-Rezeptors

Da die erste *BsaI*-Schnittstelle in der kodierenden Sequenz direkt hinter dem Startcodon liegt, wurden die Primer für den N-terminal getaggen MR so gewählt, dass die Erkennungssequenz von *BsaI* übernommen wurde, ohne damit Bereiche aus der kodierenden Region zu eliminieren (Primer *hMR IBA 105 for*, *hMR IBA 105 rev* siehe Tabelle 5)

Für den C-terminal-getaggen MR wurden Startcodon und Erkennungssequenz für *BsaI* in den Primer eingebaut. Die im MR bereits vorhandene *BsaI*-Schnittstelle wurde dagegen durch eine stille Mutation ausgeschaltet (Primer *hMR IBA 103 for*, *hMR IBA 103 rev*, siehe Tabelle 5).

Da der humane MR innerhalb seiner kodierenden Sequenz eine weitere Schnittstelle für *BsaI* aufweist, musste der MR über partiellen Restriktionsverdau gewonnen werden. Da die Menge an PCR-Produkt hierfür nicht ausreichend war, musste das PCR-Produkt zunächst in einen TA-Klonierungsvektor (s. Kap. 3.2.2.12.1 und 3.2.2.12.2) ligiert werden. Nach der Transformation in *E.coli* und Selektion auf LB-Kanamycin-Agarplatten wurden die im Anschluss gewonnenen Minipräparationen durch Kontrollverdau überprüft und konnten daraufhin sequentiell mit *BsaI* verdaut werden.

DNA, Restriktionsenzym, Puffer und Wasser und 0,2µl Bsal (10U/µl) wurden gemischt und für 5, 15 und 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Alle Ansätze wurden vereinigt und in den mit Bsal geschnittenen und dephosphorylierten (s. 3.2.2.10) pEXPR-IBA103 bzw.105-Vektor kloniert (s. 3.2.2.12). Der Ligationsansatz wurde dann in E.coli-Zellen (JM 109) transformiert. Nach der Plasmidpräparation und einem Kontrollverdau wurden die DNA-Sequenzen durch Sequenzierung (Firma MWG) überprüft. Für nachfolgende Versuche wurde die DNA schließlich in Mega- oder Gigapräparationen (s. 3.2.2.15) vermehrt

4.2.4.2 Expression

Die Expression des Proteins wurde im Gesamtlysat mit Hilfe eines Western-Blots und Detektion mit spezifischen Antikörpern gegen das Protein oder den angefügten Tag nachgewiesen. C- und N-terminal fusioniertes MR-Konstrukt wurden in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in 1x-Probenpuffer geerntet. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und entweder durch einen spezifischen Antikörper gegen den MR (anti-MR, 1-18 6G1, 1:100; Rabbit-anti-mouse-HRP, 1:2000) oder mit Strep-Tactin-HRP (1:4000), welches an die Affinitätssequenz bindet, überprüft (s. Abbildung 49).

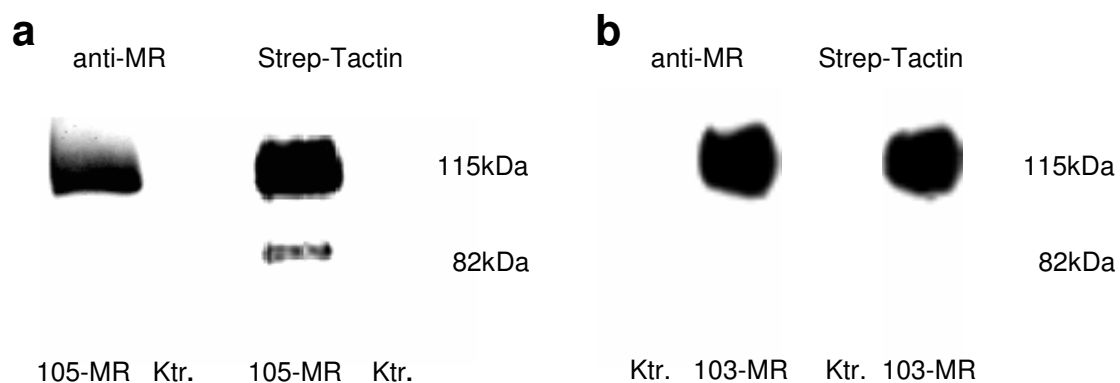


Abbildung 49 Überexpression des Strep-getaggten MR in HEK293T Zellen versus nicht-transfizierte HEK293T-Zellen (a) pEXPR-IBA105-hMR (Strep-Tag N-terminal) (b) pEXPR-IBA103-hMR (Strep-Tag C-terminal). Detektion mit anti-MR 1-18 6G1 (1:100) und Rabbit-anti-mouse-HRP (1:2000) bzw. mit Strep-Tactin-HRP 1:4000. *Ktr.* Wildtyp-Zellen.

Um zu überprüfen, wann die Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors im Anschluss an die Transfektion maximal ist, wurden HEK293T Zellen 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion mit dem Expressionsplasmid phMR3750 in 1x Probenpuffer geerntet. Die Proteinmengen wurden bestimmt und jeweils die gleiche Menge auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran

übertragen. Der Blot wurde mit anti MR 1-18 6G1 (1:100) und anschließend mit Rabbit-anti-mouse-HRP (1:2000) inkubiert. Um zu überprüfen, dass identische Mengen Protein aufgetragen worden sind, wurde die untere Hälfte des Blots mit anti-GAPDH (1:2000) detektiert. Der Blot wurde daraufhin durch Lumineszenz detektiert.

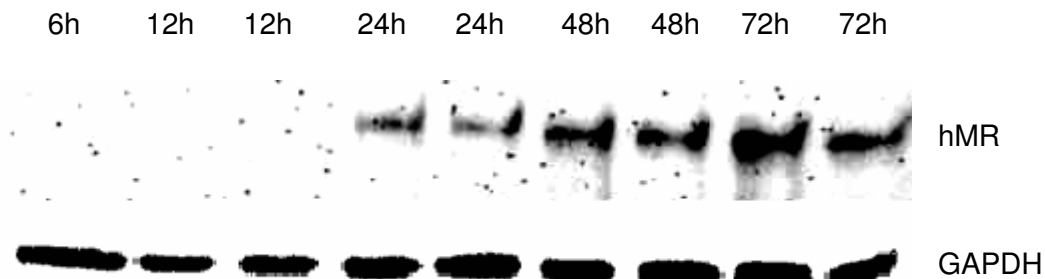


Abbildung 50 Expression des humanen Mineralocorticoid-Rezeptors nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden in HEK293T Zellen. Die Zellen wurden in 1x Probenpuffer geerntet und anschließend über Gelelektrophorese aufgetrennt. Der hMR wurde im Western-Blot mit anti-MR 1-18 6G (1:100) bzw. anti-GAPDH (1:2000) und Rabbit-anti-mouse-HRP (1:2000) detektiert.

Nach 6 und 12 Stunden konnte im Western-Blot noch kein MR nachgewiesen werden. Die Expression war nach 48 Stunden etwas höher als bei den nach 24 Stunden geernteten Proben. Nach weiteren 24 Stunden (72h-Wert) konnte eine weitere Zunahme der Expression beobachtet werden. Für alle weiteren Untersuchungen des Mineralocorticoid-Rezeptors wurde demzufolge eine Expressionsdauer von 72 Stunden gewählt.

4.2.4.3 Funktionalität: Luciferase/Galaktosidase

Mit Hilfe eines Transaktivierungsassays konnte ebenfalls die Funktionalität der Strep-Tag-MR-Konstrukte belegt werden. Die Durchführung erfolgte analog zu den oben beschriebenen MR-Fusionskonstrukten.

Wie in Abbildung 51 dargestellt, wurden beide mit einem Strep-Tag versehenen MR-Fusionsplasmide sowohl durch Stimulation mit 1nM Aldosteron als auch mit 1nM Aldosteron plus 1 μ M RU486 im Vergleich zur mit Ethanol inkubierten Kontrolle um den Faktor 30 aktiviert.

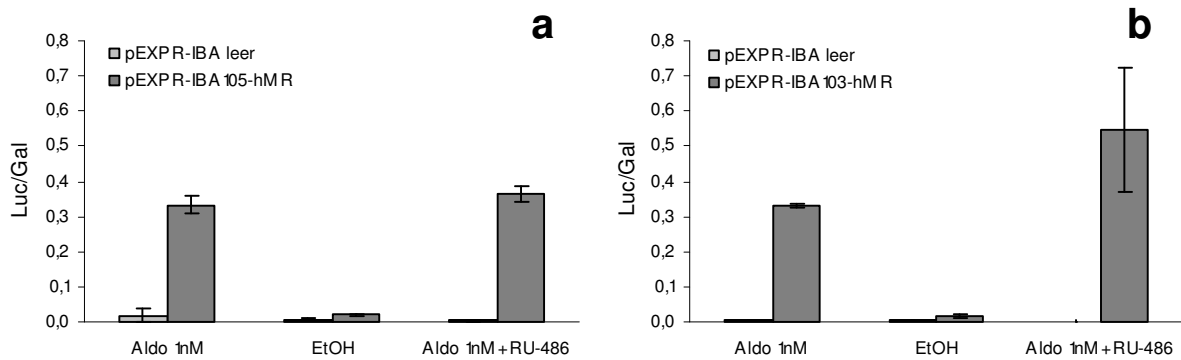


Abbildung 51 Transkriptionelle Aktivierung von Strep-Tag MR (a) pEXPR-IBA105-hMR (N-terminales Strep-Tag) (b) pEXPR-IBA103-MR (C-terminales Strep-Tag). HEK293T Zellen wurden transient mit dem Reporter-genplasmid MMTV-Luc transfiziert. Die Expressionsvektoren pEXPR-IBA und pEXPR-IBA-hMR wurden kotransfiziert. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C mit 1nM Aldosteron mit oder ohne Zusatz von RU-486 oder mit Ethanol inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier separaten Transfektionen, die an einem Tag durchgeführt wurden. Jede Probe wurde doppelt gemessen (n=8). Vergleichbare Ergebnisse wurden aus einer weiteren Messung an einem anderen Tag erhalten.

Um für weitere Versuche die Aldosteron-Konzentration zu ermitteln, bei der die transkriptionelle Aktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors maximal ist, wurde mit dem N-terminalen Fusions-Konstrukt zusätzlich eine Versuchsreihe mit ansteigenden Aldosteron-Konzentrationen durchgeführt. Hierfür wurde das Fusionsplasmid pEXPR-IBA105-hMR in HEK293T-Zellen transfiziert und die Zellen für 24 Stunden mit 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M sowie 10^{-8} M Aldosteron stimuliert. Die stärkste Aktivierung wurde mit Aldosteron-Konzentrationen von 10^{-9} M (1nM) bis 10^{-8} M (10nM) Aldosteron erzielt (s. Abbildung 52). Zur Isolierung des MR wurden HEK293T-Zellen in allen folgenden Versuchen mit 10nM Aldosteron stimuliert.

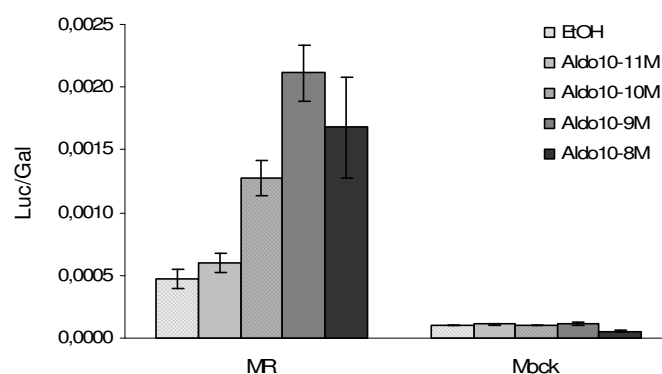


Abbildung 52 Transaktivierung des MR nach Stimulation mit Aldosteron. HEK293T Zellen wurden mit pEXPR-IBA105-hMR bzw. leerem Expressionsvektor transfiziert und für 24h mit steigenden Aldosteron-Konzentrationen (10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M) stimuliert. Mock mit leerem pEXPR-IBA105 Plasmid transfiziert

4.2.4.4 Isolierung des MR und Identifizierung von interagierenden Proteinen

Die im Großmaßstab vermehrte Plasmid-DNA (s. Kap. 3.2.2.15) der Fusionskonstrukte pEXPR-IBA103/105-hMR und des leeren Vektors wurde in HEK293T-Zellen transfiziert. Pro Ansatz wurden jeweils 20 große Zellkulturschalen (Ø15cm) eingesetzt. Die Transfektion wurde für diese Versuche im Großmaßstab mittels der Calciumphosphat-Methode (s. Kap.3.2.1.4.2.) durchgeführt. Mit dieser Methode wurden Transfektions-Effizienzen zwischen 50 und 80% erreicht. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch zwei Waschschrte und einen Mediumwechsel wurde das Calciumphosphat aus dem Kulturmedium entfernt und die Inkubation bei 37°C fortgesetzt. Die Ernte erfolgte 72h nach der Transfektion. Die Zellen wurden entweder mit 10nM Aldosteron für 5 Minuten oder zwei Stunden, mit Spironolacton oder mit Cortisol und/oder Carbenoxolon stimuliert.

Das Fusionsprotein wurde affinitätschromatographisch aus dem Gesamtproteinextrakt der Zellen über die Bindung des Strep-Tag an mit Strep-Tactin gefüllte Säulen (s. Kap. 3.2.3.6.2) aufgereinigt. Hierbei wurde der Mineralocorticoid-Rezeptor zusammen mit seinen interagierenden Proteinen durch Elution mit Desthiobiotin isoliert. Da die Zugabe von DTT oder Molybdat zur Stabilisierung des Steroidrezeptor-Protein-Komplexes beiträgt^{92,93}, wurden Lyse-, Wasch- und Elutionspuffer sowohl DTT als auch Molybdat zugesetzt, um eine vorzeitige Dissoziation der assoziierten Proteine zu unterbinden.

Nach der Elution des Proteinkomplexes über Strep-Tactin-Säulen wurden im Western-Blot diejenigen Fraktionen identifiziert, in denen der MR eluiert wurde und über eine Centricon-Mikrokonzentrationseinheit (Amicon) auf ~70µl Volumen eingeeengt (s. Kap. 3.2.3.5). 20µl der konzentrierten Proteinlösung wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und in einer eindimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie oder Silber gefärbt (s. Kap. 3.2.3.4.1). Eine Färbung des Gels mit Coomassie ist zwar deutlich weniger sensitiv im Vergleich zu einer Silberfärbung, nimmt auf der anderen Seite jedoch weniger Einfluss auf die Proteine, da es nicht zu einer kovalenten Modifikation der Proteine führt. Da später eine massenspektrometrische Untersuchung der Proteine stattfinden sollte, wurde hier die Coomassie-Färbung bevorzugt verwendet.

Aus den mit Coomassie gefärbten Gelen wurden Banden ausgeschnitten und einem Trypsinverdau unterzogen. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe von ZipTip® C18 reverse phase Pipettenspitzen (Millipore) gereinigt und entsalzt, bevor sie auf das MALDI Target gespottet wurden. Es wurden sowohl Messungen mit einem Biflex III (Bruker) als auch mit einem Ultraflex (Bruker, Uni Kaiserslautern) durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels MASCOT.

Sowohl N- (pEXPR-IBA105) als auch C-terminal (pEXPR-IBA103) mit dem MR fusionierter MR wurden in HEK293T transfiziert und nach Inkubation mit Aldosteron (10nM, 5 Minuten) oder Ethanol aufgereinigt. Die isolierten Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (s. Abbildung 53). Aus dem 1D-Gel wurden Banden ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert.

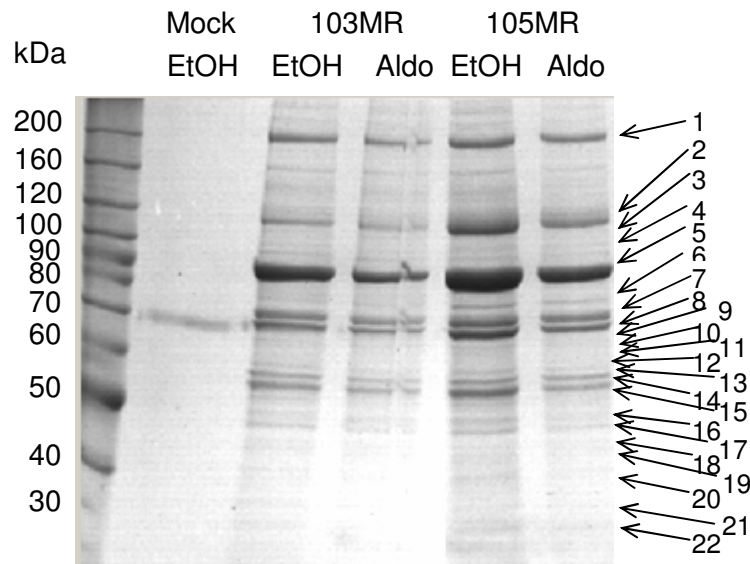


Abbildung 53 Isolierung von N- und C-terminal Strep-Tag fusionierten hMR und interagierender Proteine nach Stimulation mit 10nM Aldosteron (5 Minuten). Die isolierten Proteine wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Der Versuch wurde dreimal mit den gleichen Ergebnissen wiederholt (n=3). *EtOH* 0,0001% Ethanol, *Aldo* 10nM Aldosteron, *Mock* mit leerem Vektor transfiziert.

Die relativ große Anzahl an interagierenden Proteinen deutet darauf hin, dass der MR in der Zelle in Form eines Multiproteinkomplexes vorliegt, wie dies bereits für den GR gezeigt wurde^{94,95}. Eine gleichzeitige Interaktion mit allen identifizierten Proteinen ist aufgrund der Größe des MR sehr unwahrscheinlich, da der MR nicht genug Bindungsstellen für eine direkte Bindung aller Proteine besitzt.

Der MR kommt in verschiedenen Zuständen vor: (1) inaktiv im Zytosol an Hitzeschockproteine gebunden; (2) nach der Bindung von Ligand und Dissoziation von Hitzeschockproteinen im Transferzustand; (3) im Zellkern an DNA gebunden. In jedem dieser Zustände differiert sehr wahrscheinlich die Zusammensetzung der mit dem MR interagierenden Proteine, des „Interactoms“.

Bei der gewählten Affinitätschromatographischen Methode kann zudem nicht zwischen direkten und indirekten Interaktionspartnern unterschieden werden, so dass es sich möglicherweise bei einigen der identifizierten Proteine um indirekte Interaktionen mit dem MR handelt.

Im nicht-aktivierten Zustand befindet sich der MR, an Hitzeschockproteine gebunden, im Zytosol. In unstimulierten (EtOH) Zellen konnten dementsprechend einige interagierende Hitzeschockproteine identifiziert werden. Hierzu gehören HSP90, zwei HSP70-Proteine sowie ein Mitglied der GroEL-Familie (GRP78).

Nach Stimulierung mit Aldosteron dissoziieren Hitzeschockproteine, der Rezeptor wandert in den Zellkern. Demgemäß waren Hitzeschockproteine in Gegenwart von Aldosteron in geringerer Zahl an den MR gebunden als im unstimulierten Zustand. Im Coomassiegefärbten SDS-Gel war die HSP90-Bande deutlich intensiver als die des MR, während die Bande für HSP70 schwächer als die des MR ausgeprägt war. Bresnick et al.⁹⁶ haben für den GR ein Verhältnis von HSP90 zum Rezeptor je nach Versuchsbedingungen von 2:1 bis 4:1 festgestellt. In Untersuchungen von Diehl und Schmidt⁹⁷ lag der GR im Vergleich zu HSP70 in einem Verhältnis von 5:1 vor.

Es konnten allerdings keine differentiell rekrutierten Proteine nach einer Stimulierung mit Aldosteron (5 Minuten) im Vergleich zu Ethanol-behandelten Zellen beobachtet werden. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob eine Verlängerung der Inkubationsdauer mit Aldosteron zu einer Veränderung im Proteinmuster der interagierenden Proteine führt. Wie aus Abbildung 54 zu erkennen ist, waren nach einer Stimulation des MR in überexprimierenden HEK293T-Zellen mit 10nM Aldosteron und anschließender Isolierung des MR-Proteinkomplexes keine Unterschiede zwischen einer Inkubationsdauer mit Aldosteron von 5 Minuten und 2 Stunden zu erkennen.

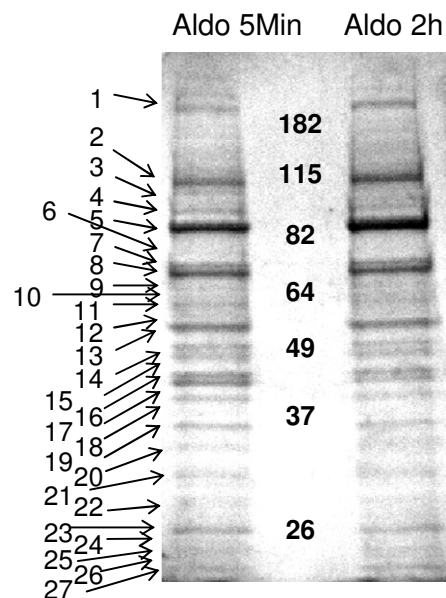


Abbildung 54 Isolierung des N-terminal Strep-Tag fusionierten hMR und interagierender Proteine nach Stimulation mit 10nM Aldosteron für 5 Minuten oder 2 Stunden. Die isolierten Proteine wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Nachfolgend sind alle MR-interagierenden Proteine, die durch Massenspektrometrie identifiziert werden konnten, tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 12 Übersicht über MR-interagierende Proteine, identifiziert durch MALDI Massenspektrometrie *err* errechnet *Gel*/Masse aus Gel abgeschätzt

Spot Nr. 1D Gel	Genbank Accession Nr.	Protein	Molekulare Masse (kDa)		Anzahl der übereinstimmenden Peptide	Sequenz-Abdeckung (%)
			<i>err</i>	<i>Gel</i>		
2	AAA59571	Mineralocorticoid-Rez.	108,5	110	12	15
4	P13639	Elongationsfaktor 2	96,1	92	11	18
5	P08238	HSP 90 beta (HSP84)	83,4	85	13	24
5	P07900	HSP 90 alpha (HSP86)	85,0	85	14	23
6	P11021	dnaK-type molecular chaperone HSPA5 precursor (GRP78)	72,2	75	13	24
7	M11717	Dnak-type molecular chaperone HSPA1L	70,1	70	18	37
8	BC007276	HSPA8	64,8	70	8	17
9	AAC50068	hTRiC-P5	60,9	66	7	17
10	P05166	β -Propionyl-CoA-carboxylase beta chain precursor	58,8	58	15	41
12	BAD96744	Tubulin alpha 6 variant (Fragment)	50,5	55	8	29
13	CAI41893	Tubulin- beta polypeptide	48,1	52	9	29
14	P06733	Alpha Enolase	47,0	47	9	35
15	BC007949	Elongationsfaktor 1 gamma	50,2	46	11	31
16	M16440	Kreatinkinase chain B	42,9	43	9	22
17	Q96E97	Aktin	40,5	42	6	24
18	NP_002286	Ribosomales Protein RS 40K	32,9	39	10	48
19	P04075	Fructose-bisphosphat-aldolase A	39,7	36	8	37
20	P04406	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase	36,0	35	9	38
21	Q5U077	L-Laktatdehydrogenase	36,9	32	7	22
22	Q4VJB6	Protein 14-3-3 epsilon	26,7	28	5	22
23	BC008748	Protein-L-isoaspartat-O-methyltransferase	24,8	25	12	50
27	AAA18537	p23	19,0	18	7	45
26	P37802	Transgelin-2	22,4	20	8	51

Die möglichen Interaktionspartner des Mineralocorticoid-Rezeptors, die unabhängig vom jeweiligen Stimulus gefunden wurden, lassen sich in 5 Gruppen einteilen und sollen im Folgenden näher charakterisiert werden.

1. Hitzeschockproteine/Chaperone
2. Proteine des intrazellulären Transportapparates
3. Metabolische Enzyme
4. Elongationsfaktoren
5. Sonstige

1. Interaktionen des Mineralocorticoid-Rezeptors mit Chaperonen

Bei den identifizierten Chaperonen als putative MR-Bindungspartner handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um spezifische Interaktionen, da bekannt ist, dass sich der MR im nicht aktivierten Zustand, an Hitzeschockproteine gebunden, im Zytosol befindet. Nach Aktivierung durch Liganden dissoziiert der MR von den Hitzeschockproteinen und wandert in den Zellkern. Außer dem **Hitzeschockprotein 90 beta** und dem Hitzeschockprotein **90 alpha** konnten zwei **HSP70**-Proteine (HSPA8 und dnaK type molecular chaperone HSPA1L oder HSP70K) gefunden werden.

Eine Interaktion des MR mit HSP90 wurde bereits mehrfach beschrieben⁹⁸⁻¹⁰². Die Bindung von HSP90 an den MR stabilisiert den Rezeptor in seiner Hormon-bindenden, transkriptionell inaktiven Form¹⁰³. Für den GR wurde gezeigt, dass die Hormon-bindende Domäne (HBD) zuerst an HSP90 gebunden sein muss, bevor der Rezeptor Steroid binden kann^{92,104}. Durch die Bildung dieses Heterokomplexes wird die GR HBD von einer nicht-Steroid-bindenden in eine Steroid-bindende Form überführt¹⁰⁵.

Bruner und Kollegen¹⁰⁶ haben sowohl eine Interaktion des MR mit HSP90 als auch mit HSP70 beschrieben. HSP70 wurde zudem von Sanchez et al.¹⁰⁷ als möglicher MR-Interaktionspartner gefunden. Auch HSP70 interagiert über die HBD mit Steroidrezeptoren¹⁰⁸. Proteine der HSP70-Familie assistieren in der korrekten Faltung neu synthetisierter Proteine, in der Neufaltung teilweise denaturierter oder falsch gefalteter Proteine sowie im Abbau irreparabel geschädigter Proteine¹⁰⁹. Sie interagieren vermutlich mit Strukturen des Zytoskeletts und sind in Vorgänge der Translokation von Proteinen quer durch Membranen in Organellen involviert, worauf in dieser Arbeit später noch näher eingegangen wird^{109,110}.

Zur Formierung des Glucocorticoidrezeptor-HSP90 Komplexes werden neben ATP/Mg²⁺, einem monovalenten Kation wie K⁺¹¹¹, mindestens die drei weiteren Proteine HSP70¹¹², p60¹¹³ und p23¹¹⁴ benötigt, die der übergeordneten Gruppe der Chaperone angehören. In unseren Versuchen konnte auch das **Progesterone-receptor-related protein p23** als MR-interagierendes Protein isoliert werden. p23 wurde sowohl von Freeman et al.¹¹⁵ als

auch von Hutchison et al.¹¹⁴ als Interaktionspartner von nukleären Rezeptoren beschrieben. Zudem konnten Martinez-Yamout et al.¹¹⁶ p23 als Interaktionspartner von HSP90 identifizieren. p23 ist einerseits ein regulatorisches Ko-Chaperon von HSP90, kann aber auch alleine als allgemeines molekulares Chaperon fungieren¹¹⁷. Es interagiert mit HSP90 als regulatorischer Kofaktor und bindet an die ATP-gebundene Form von HSP90^{118,119}. Freeman und Yamamoto¹²⁰ entdeckten, dass p23 nicht nur in die Aktivierung des GR involviert ist, sondern auch in seine Inaktivierung, indem es das Trennen transkriptionell regulatorischer Komplexe fördert. Außerdem führte p23 zu einer herabgesetzten Besetzung von GREs durch den GR. Wochnik et al.¹¹⁷ postulieren, dass dieser Effekt von p23 auf die Inhibierung des GR Folge seiner Funktion als Ko-Chaperon von HSP90 und nicht Folge seiner intrinsischen Chaperon-Aktivität ist.

Wie bereits weiter oben erwähnt (s. Seite 97), wurde zur Isolierung interagierender Proteine des MR sowohl dem Lyse- als auch dem Wasch- und Elutionspuffer Molybdat zugesetzt, um den MR-Komplex zu stabilisieren. In Studien zu Steroidrezeptor-Komplexen konnte gezeigt werden, dass Molybdat hier als sehr wirksames stabilisierendes Reagenz diente^{92,93}. Sullivan et al.¹¹⁸ spekulieren, dass Molybdat an HSP90 an der Position bindet, an der das γ -Phosphat von ATP nach ATP-Hydrolyse zu ADP bindet. Hierdurch würde HSP90 in der „ATP-gebundenen“ Konformation verbleiben und könnte so mit p23 interagieren.

Während HSP90 in den ersten Schritten der Rezeptor-Wirkung mit den Steroidrezeptor-Aporezeptoren interagiert, scheint p23 in einem oder mehreren späten Schritten zu operieren. Der Vorgang von Hormonbindung und Translokation in den Zellkern nimmt nur wenige Minuten in Anspruch¹²¹, die Effekte von p23 auf die Wirkung der Steroidrezeptoren AR, GR, TR und MR traten jedoch in Versuchen von Freeman et al.¹¹⁵ erst nach etwa 8 Stunden auf. Sie spekulieren, dass p23-Proteine auf Hormon-gebundene Holorezeptoren wirken, um die Liganden-Wirkungen wie die transkriptionelle Aktivierung zu verändern. Sie bezeichnen diese Rezeptoren als sogenannte „erfahrene Rezeptoren“, die an ein Response-Element gebunden und die Transkription reguliert haben. p23 würde demnach an ternäre Holorezeptor-Response-Element-Komplexe binden und die Wirkungskraft erhöhen oder senken. Erstaunlicherweise übten p23-Proteine in den Untersuchungen von Freeman et al.¹¹⁵ stimulierende Effekte auf die GR-Aktivität aus, die Aktivität von AR, TR und MR wurde hingegen herabgesetzt. Daher wäre es interessant zu überprüfen, wie diese entgegen gesetzten Wirkungen auf GR und MR zustande kommen und ob hierfür eventuell weitere Interaktionspartner verantwortlich sind, die in diesen Vorgang regulierend eingreifen.

Als weiteres putatives MR-bindendes Chaperon wurde das Protein **TCP-1 Ring-Komplex-Protein TRiC5**, auch bekannt als CCT („Chaperonin-containing t-complex polypeptide 1“), isoliert. Dieser Chaperon-Komplex ist in allen eukaryotischen Zellen vorhanden. TRiC weist sowohl strukturell als auch funktionell sehr viele Ähnlichkeiten mit Mitgliedern der HSP60/GroEL-Familie auf. TRiC5 befindet sich vorwiegend im Zytoplasma, ist aber auch im Zellkern zu finden, wo es an die nukleäre Matrix gebunden ist, einem komplexen Netzwerk, das in essentielle zelluläre Funktionen wie DNA Replikation und RNA Transkription involviert ist¹²². TRiC bindet an nicht-gefaltete Proteine und verhindert so deren Aggregation. Man hielt TRiC ursprünglich für ein Protein, das auf die Faltung von Aktin und Tubulin spezialisiert ist^{123,124}; eine Interaktion von TRiC mit Aktin und Tubulin ist bereits 1993 beschrieben worden¹²⁵⁻¹²⁷. Inzwischen weiß man aber, dass TRiC ein breiteres Substrat-Spektrum aufweist. Neben Aktin und Tubulin interagiert es auch mit anderen Proteinen des Zytoskeletts¹²⁸ sowie weiteren Proteinen, die in verschiedenste zelluläre Prozesse involviert sind¹²⁹⁻¹³³ wie z.B. heterotrimeren G-Proteinen^{134,135}.

Es konnte gezeigt werden, dass TRiC zum einen direkt oder indirekt über das HSP70/HSP90 organisierende Protein Hop/p60¹³⁶ mit HSP70 interagiert¹³². Eine Studie von McCallum et al.¹³⁷ belegte, dass TRiC mit translatierten Polypeptiden unmittelbar, nachdem sie aus dem Ribosom hervortreten, assoziiert. Dies lässt auf eine enge Verbindung zwischen dem Chaperonin und dem Translationsapparat schließen. Es existiert zurzeit zwar noch kein Nachweis einer direkten physikalischen Interaktion zwischen TRiC und Komponenten der Translationsmaschinerie. Die Bindung von TRiC an neu translatierte Polypeptide könnte aber durch andere Bestandteile der Faltungsmaschinerie unterstützt werden, z.B. durch das Hsc-HSP70 System.

Mittels einer Photo-cross-linking Methode entdeckten McCallum und Kollegen¹³⁷ ferner einen Cross-link von TRiC mit Enolase, die ebenfalls von uns im Komplex mit MR gefunden wurde. Diese Interaktion war so schwach, dass sie mit einer herkömmlichen Immunpräzipitation nicht festgestellt werden konnte. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Kubo et al.¹³⁸, die eine Interaktion des TRiC Homologs GroEL mit Enolase ermittelt haben. Eine Interaktion von GroEL mit metabolischen Enzymen wurde bereits mehrfach dargestellt. Kawata et al.¹³⁹ fanden heraus, dass GroEL in der Anwesenheit von ADP unter anderem die Faltung des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) förderte (ebenfalls im Komplex mit MR assoziiert), während in der Abwesenheit von Nukleotiden die Faltungsreaktion durch GroEL gestoppt wurde. Zusätzlich schützten GroEL und ADP die LDH vor einer Hitzeinaktivierung. Auch Badcoe et al.¹⁴⁰ beschreiben eine Interaktion von GroEL mit dem Faltungsprozess von LDH. Darüber hinaus ist eine Interaktion von GroEL mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) erwähnt worden¹⁴¹.

2. Interaktion des MR mit Proteinen des intrazellulären Transportapparates

Eine ebenfalls spezifische Interaktion liegt vermutlich bei den isolierten und massenspektrometrisch identifizierten Proteinen des intrazellulären Transportapparates wie **Tubulin beta**, **Tubulin alpha 6** und **Aktin beta** vor.

Jalaguier et al.¹⁴² konnten zeigen, dass die Hormon-bindende Domäne des MR sowohl mit F-Aktin als auch mit G-Aktin interagiert und dass diese Interaktion durch spezifische Mineralocorticoid Liganden moduliert wird. Die Bindung von Aldosteron an den MR verhinderte fast komplett die Interaktion mit F-Aktin, während Spironolacton keinen Einfluss ausübte. Golestaneh und Kollegen¹⁴³ konnten eine Aldosteron-abhängige Interaktion von hMR und Tubulin-Filamenten belegen. Darüber hinaus zeigten sie, dass ein intaktes Zytoskelett für die transkriptionelle Aktivierung des ENaC durch hMR notwendig ist.

Bei der durchgeführten Affinitätschromatographischen Isolierung von Proteinkomplexen kann nicht unterschieden werden, ob es sich bei den identifizierten Proteinen um direkte oder indirekte Interaktionspartner des MR handelt. Daher wäre auch eine indirekte Interaktion des MR mit Tubulin oder Aktin, z.B. über Hitzeschockproteine, denkbar.

Koyasu et al.¹⁴⁴ sowie weitere Autoren konnten zeigen, dass Aktin mit HSP90 interagiert^{145,146}. In mehreren Arbeiten wurde zudem eine Kollokalisierung von HSP70¹⁴⁷ und HSP90¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ mit verschiedenen weiteren Bestandteilen des Zytoskelett-Netzwerks wie Mikrotubuli und Mikrofilamenten beschrieben. Für den Glucocorticoid-Rezeptor konnte bereits nachgewiesen werden, dass er Aktinfilamente über HSP90 bindet¹⁵¹. Pratt und Kollegen¹⁵² spekulieren des Weiteren für den Glucocorticoid-Rezeptor, dass der HSP-Rezeptor-Komplex als Transportpartikel oder Transportosom für den bidirektionalen Transport in und aus dem Zellkern dienen könnte. Da der HSP90-GR-Komplex an Aktin bindet¹⁵¹, könnte dieses „Shuttling“ möglicherweise über eine Interaktion mit Aktin und Tubulin kontrolliert werden. Auch für den Androgen-Rezeptor wurde gezeigt, dass er Strukturen des Zytoskeletts für eine Translokation in den Zellkern benötigt¹⁵³.

3. Interaktionen des MR mit metabolischen Enzymen

Viele glykolytische Enzyme binden reversibel an Proteine des Zytoskeletts^{154,155}. Hierzu zählen die muskuläre Form der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (Aldolase), Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), 3-Phosphoglyceratkinase, Glukosephosphat-Isomerase, Phosphofruktokinase, Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase (LDH) und Enolase. In den hier gezeigten Versuchen konnten vier der eben genannten glykolytischen Enzyme als Komponente im MR-Komplex isoliert werden, die nachfolgend näher charakterisiert werden.

Einige glykolytische Enzyme wie LDH, GAPDH und Aldolase konnten in verschiedenen Zellsystemen im nukleären Kompartiment nachgewiesen werden. Teilweise lagen die

Enzyme im Zellkern in einer modifizierten Form im Vergleich zu den im Zytoplasma gefunden Enzymen vor. Ronai et al.¹⁵⁶ beschreiben, dass die nukleären Formen dieser Enzyme alle an DNA binden. Obwohl keines dieser Enzyme mit einer spezifischen DNA-Target Sequenz interagiert, könnte deren Assoziation mit DNA eine Rolle in Transkription und Replikation von DNA spielen, indem sie die nukleäre Matrix oder Chromatin-Struktur stabilisieren.

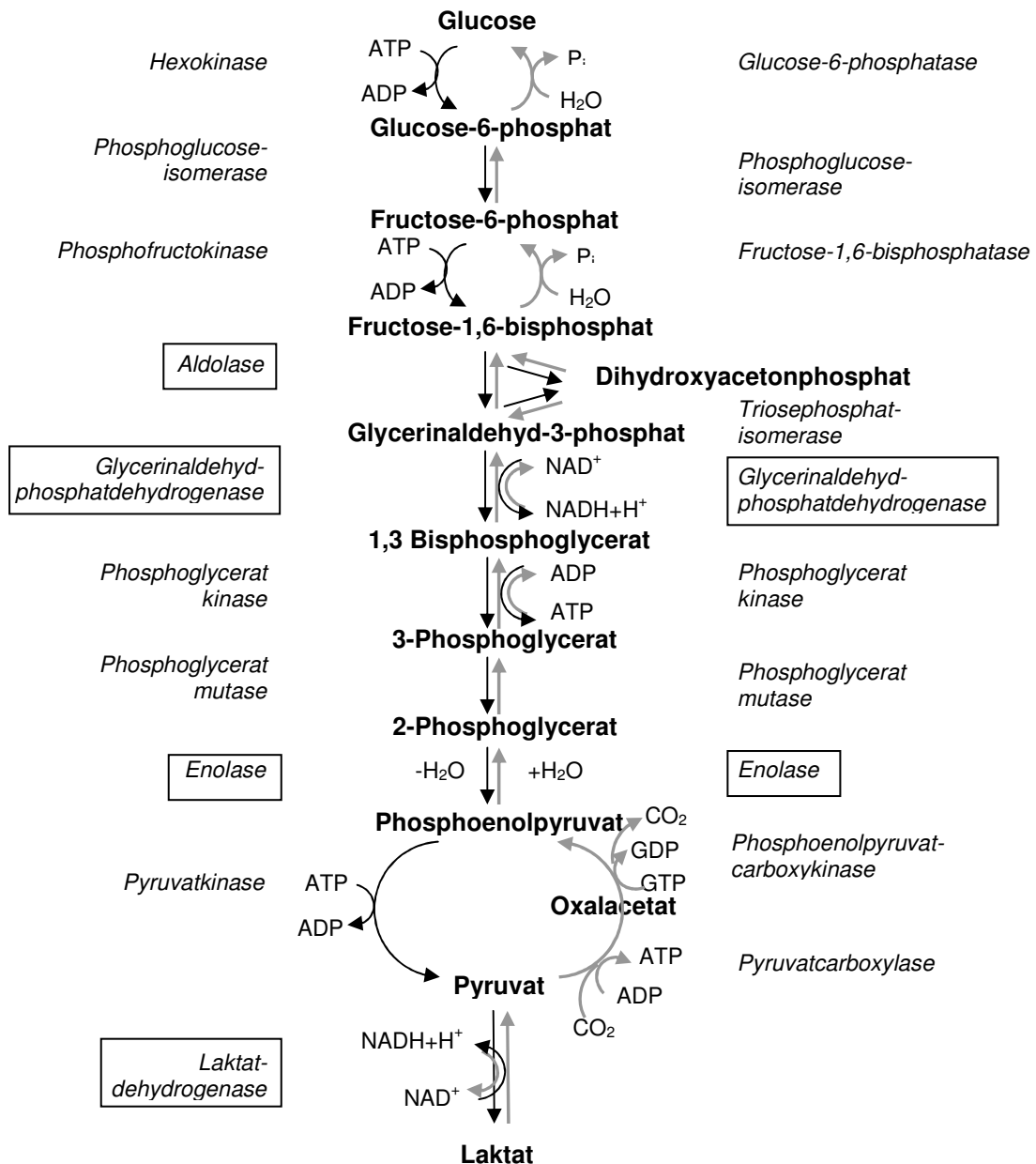


Abbildung 55 Schematische Darstellung von Glykolyse (links) und Glukoneogenese (rechts) und den daran beteiligten Enzymen. Die massenspektrometrisch identifizierten potentiellen Interaktionspartner des MR sind hervorgehoben.

- **Fructose-bisphosphat-aldolase A** Fructose-bisphosphat-aldolasen sind ubiquitäre Enzyme, die die Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat katalysieren. Aldolase spielt nicht nur eine Schlüsselrolle in der Glykolyse, sondern bindet auch an Makromoleküle, die keine Funktion in der Glykolyse einnehmen, wie z.B. Aktin¹⁵⁷⁻¹⁵⁹, GLUT4¹⁶⁰ oder Tubulin^{161,162}. Eine Interaktion von zahlreichen glykolytischen Enzymen mit Proteinen des Zytoskeletts ist schon seit vielen Jahren bekannt¹⁶³. Diese Interaktion ist möglicherweise ein Mechanismus für die Kompartimentierung des glykolytischen Signalweges. Waingeh et al.¹⁵⁷ beschreiben eine Interaktion von F-Aktin mit Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (Aldolase) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Auch Kao et al.¹⁶⁰ zeigen indirekt eine Interaktion von Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase mit F-Aktin. Sie konnten einerseits nachweisen, dass Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase mit der C-terminalen Domäne des Insulin-abhängigen Glucosetransporters GLUT4 interagiert, andererseits dass GLUT4 mit F-Aktin interagiert. Neben Aktin binden einige glykolytische Enzyme wie Aldolase A auch das Zytoskelett-Protein Tubulin^{161,162}.

- **2-phospho-D-glycerat-hydro-lyase (alpha Enolase, Phosphopyruvate hydratase).** Alpha-Enolase gehört ebenfalls zur Gruppe der glykolytischen Enzyme. Die Enolase ist ein dimeres Enzym, das sich aus den Einheiten α , β und γ zusammensetzt und Zelltyp-spezifische Isoformen ausbildet. Neben ihrer eigentlichen, ursprünglich bekannten glykolytischen Funktion nimmt dieses Enzym aber ebenso eine wichtige Rolle in verschiedenen biologischen und pathophysiologischen Prozessen ein. Das Metalloenzym α -Enolase katalysiert die Dehydratation von 2-Phospho-D-glycerat (PGA) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) sowie während der Glukoneogenese in einer umgekehrten Reaktion die Hydratation von PEP zu PGA (s. Abbildung 55). Daneben dient α -Enolase auf der Oberfläche einer Vielzahl von hämatopoetischen, epithelialen und endothelialen Zellen als Plasminogen-Rezeptor, was vermuten lässt, dass es eine wichtige Rolle im intravaskulären und perizellulären fibrinolytischen System spielt¹⁶⁴. Außerdem ist beschrieben worden, dass α -Enolase die Fähigkeit besitzt, als Hitzeschockprotein zu agieren und Zytoskelett- und chromatine Strukturen zu binden¹⁶⁵, was möglicherweise die Bindung an einen Steroidrezeptor erklärt.

- **Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)** ist ubiquitär in Zellen vorhanden, was auf den ersten Blick eine unspezifische Interaktion mit dem MR sehr wahrscheinlich macht. Allerdings gibt es einige Hinweise darauf, dass GAPDH neben seiner klassischen Funktion als glykolytisches Protein außerdem in verschiedene andere Mechanismen in der Zelle involviert ist. Hierzu gehören seine Funktionen in der Fusion

von Membranen, der Bündelung von Mikrotubuli, dem nukleären RNA Export, der DNA Replikation und DNA Reparatur und seiner Phosphotransferase Aktivität^{166,167}. In der Literatur wurden Interaktionen von GAPDH mit zahlreichen Proteinen beschrieben, unter anderem auch mit Aktin^{168,173,174}, Tubulin¹⁶⁹, mit dem Protein 14-3-3, mit LDH¹⁷⁰, sowie mit dem TRiC-Homolog GroEL¹⁴¹. Glaser et al.¹⁶⁹ postulieren, dass die Interaktion von Tubulin mit einer GAPDH-Isoform modulierend auf die Kinetik von Membran-Trafficking und zellulären Signalwegen wirkt, indem sie die Kinetik von Membranfusionen regulieren. Möglicherweise findet über diese GAPDH-bindenden Proteine eine indirekte Interaktion von GAPDH mit dem MR statt. Andererseits konnte z.B. von Koshy und Kollegen¹⁷¹ in Yeast-two-hybrid Versuchen eine Interaktion mit dem Androgen-Rezeptor festgestellt werden, so dass auch eine direkte Interaktion mit dem MR denkbar wäre.

- **L-Laktat-Dehydrogenase B chain**

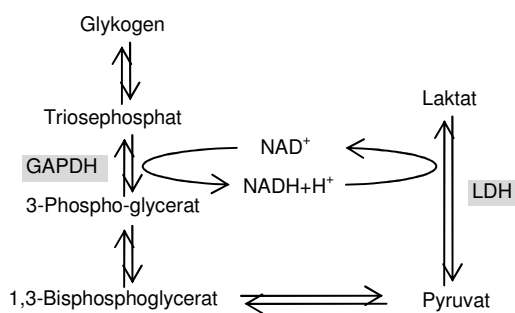


Abbildung 56 Kreislauf zwischen NAD⁺ und NADH,H⁺ in der Glykolyse

LDH spielt eine entscheidende Rolle für eine effiziente anaerobe Glykolyse. Die Glykolyse-reaktionen bis zum Pyruvat werden sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen durchlaufen. Unter aeroben Bedingungen wird Glycerinaldehyd-3-phosphat durch die Dehydrogenase GAPDH und das Koenzym NAD⁺ oxidiert. Hierbei wird NAD⁺ zu NADH,H⁺ umgesetzt.

Unter anaeroben Bedingungen liefert die Reduktion von Pyruvat mit NADH,H⁺ durch die LDH Laktat und regeneriert dabei NAD⁺. Eine Interaktion mit Steroidrezeptoren ist bislang noch nicht bekannt. Es wurden aber Interaktionen von LDH mit einigen Proteinen erwähnt, die ebenfalls als MR-Bindungspartner aufgereinigt und massenspektrometrisch identifiziert worden sind. Russell et al.¹⁷² beschreiben ein Zusammenspiel von LDH mit den Proteinen Aldolase und Aktin. LDH wurde durch Ascorbat in Konzentrationen gehemmt, die normalerweise im Gewebe vorgefunden werden. Sowohl Aldolase als auch G-Aktin waren in der Lage, LDH zu schützen und die Hemmung von LDH durch Ascorbat rückgängig zu machen. Es wurde bereits mehrfach eine Interaktion von LDH^{173,174} bzw. D-LDH (DLD)¹⁷⁵ mit Aktin beschrieben. LDH bildet mit F-Aktin einen Komplex, in dem ein Molekül des Enzyms vier Aktin Monomere bindet. Die Bildung dieses Komplexes resultiert in einer Inaktivierung von LDH¹⁷³. Auch eine Interaktion von LDH mit GAPDH ist gezeigt worden¹⁷⁰. Möglicherweise sind LDH, Aldolase und Aktin Teil eines MR-Multiproteinkomplexes.

Die isolierten Enzyme Aldolase, Enolase, LDH und GAPDH sind alle an Reaktionen des Glukose-Metabolismus beteiligt, wie in Abbildung 55 dargestellt ist. Eine Stimulation der hepatischen Glukoneogenese durch Glucocorticoide ist unumstritten¹⁷⁶. Dies erfolgt hauptsächlich durch Erhöhung der Transkription glukoneogenetischer Enzyme wie Phosphoenolpyruvat-carboxykinase (PEPCK)¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ und Glucose-6-phosphatase¹⁸⁰. Für den Mineralocorticoid-Rezeptor existierte bislang erst ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung in Prozessen der Glukoneogenese. Liu und Kollegen¹⁸¹ zeigten eine neue Rolle für den Mineralocorticoid-Rezeptor in der Genregulation der hepatischen Glucoseproduktion auf. Der MR regulierte sowohl die Expression von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Glucose-6-phosphatase als auch die von Fructose-1,6-bisphosphatase 1.

Da eine so große Anzahl von Enzymen des Glukose-Metabolismus über Affinitätschromatographie und massenspektrometrische Analyse identifiziert worden ist, könnte dies auf eine Funktion hindeuten. Ob es sich um direkte oder indirekte Interaktionen mit dem MR handelt und inwieweit diese physiologisch eine relevante Rolle spielen, lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht sagen und muss in zukünftigen Versuchen geklärt werden.

Es konnten zwei weitere Proteine mit metabolischen Eigenschaften aus den SDS-Gelen als mögliche Interaktionspartner des MR isoliert werden: Protein-L-isoaspartat-O-methyltransferase und Kreatinkinase. **Protein-L-isoaspartat-O-methyltransferase (PCMT)** (oder auch PRIP-interacting protein with methyltransferase domain) kommt nahezu ubiquitär vor, bei Säugetieren in den höchsten Konzentrationen in Gehirn, Hoden und Herz, konnte aber auch in der Niere detektiert werden^{182,183}. PCMT katalysiert die Reparatur von Proteinen, deren Isoaspartyl-Reste modifiziert worden sind und verhindert so eine Akkumulierung von geschädigten Proteinen, die diese abnormalen Aspartyl-Reste enthalten^{184,185}.

Es wurde bisher noch keine Interaktion zwischen dem Mineralocorticoid-Rezeptor und PCMT gezeigt. Es wurde jedoch mehrfach beschrieben, dass PCMT mit dem nukleären Rezeptor Koaktivator PRIP (peroxisome proliferator-activated receptor-interacting protein) interagiert und dessen Koaktivator Funktion verstärkt¹⁸⁶. PCMT bindet zum einen S-adenosyl-l-methionin, den Methyl donor für die Methyltransfer Reaktion, zum anderen bindet es RNA, was vermuten lässt, dass PCMT möglicherweise eine RNA-Methyltransferase Funktion besitzt. Zhu et al.¹⁸⁶ postulieren ebenfalls, dass PCMT die transkriptionelle Aktivität der nukleären Rezeptoren PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor) und Retinoid-X-Rezeptor α erhöht, was durch eine Koexpression von PRIP weiter verstärkt wird. Dies lässt darauf schließen, dass PCMT als Bestandteil des nukleären Rezeptor Signaltransduktions-Apparates über PRIP agiert. Es konnte ebenso

gezeigt werden, dass PCMT mit anderen transkriptionellen Koaktivatoren wie CBP, p300 und PBP interagiert, jedoch nicht mit SRC-1 und PGC-1 alpha¹⁸⁷.

Von dem Enzym **Kreatinkinase** existieren drei Formen, eine zytoplasmatische Muskel- (MCK), eine zytoplasmatische Gehirn- (BCK) und eine mitochondriale (MtCK) Variante¹⁸⁸. Alle Isoenzyme spielen eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus. Mehrere der identifizierten MR-bindenden Proteine interagieren ebenfalls mit Kreatinkinase. So konnte eine Interaktion von Kreatinkinase mit β -Enolase im Skelettmuskel¹⁸⁹ gezeigt werden. Daneben wurde in Interaktionsstudien zur Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKII β) eine Interaktion mit den glykolytischen Enzymen GAPDH, Kreatinkinase, Aldolase A, Enolase, LDH, Pyruvatkinase, Phosphorylase B Kinase in der zytosolischen Membran festgestellt¹⁹⁰, was das Vorkommen dieser metabolischen Enzyme in Form eines Multiproteinkomplexes denkbar macht.

4. Elongationsfaktoren

Die molekulare Kommunikation zwischen Mineralocorticoid-Rezeptor und Proteinsynthese-Maschinerie kann zum einen über direkte Protein-Protein-Interaktionen zwischen MR und Transkriptions-/Translationsapparat oder über indirekte Interaktionen, die durch Koregulatoren vermittelt werden, erfolgen.

Es konnten Proteine der Translationsmaschinerie identifiziert werden. Neben dem **eukaryotischen Elongationsfaktor 1 gamma (eEF-1 γ)** wurde auch der **eukaryotische Elongationsfaktor 2 (eEF-2)** isoliert. Elongationsfaktoren nehmen eine entscheidende Position im Elongationsvorgang und damit der Proteinsynthese ein. eEF-1 setzt sich aus den vier Untereinheiten α , β , γ und δ ¹⁹¹ zusammen. Während eEF-1 α eher diffus im Zytoplasma und im Zellkern zu finden ist, sind die Untereinheiten β , γ und δ hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Bisher ist allerdings noch nicht genau bekannt, wie der eEF-1 $\alpha\beta\gamma\delta$ Komplex mit dem ER interagiert¹⁹². Die hauptsächliche Funktion von eEF-1 im Prozess der Proteinbiosynthese besteht in der Bindung von Aminoacyl(aa)-tRNAs und deren Transport ans Ribosom. Hierfür dient die an GTP gebundene alpha-Untereinheit als Carrier. Nach dem Transport der aa-tRNA ans Ribosom und der Hydrolyse von GTP wird der inaktive Elongationsfaktor-1 α GDP durch den eEF-1 $\beta\gamma\delta$ Komplex zu eEF-1 α GTP recycelt.

Der Elongationsfaktor-1 γ ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 50kDa. eEF-1 γ besitzt GDP/GTP Austausch Aktivität und stimuliert die eEF-1 α abhängige Bindung von aa-tRNA ans Ribosom. Die genaue physiologische Bedeutung von eEF-1 γ ist bislang noch nicht bekannt. Möglicherweise besitzt es einige zelluläre regulatorische Funktionen. Janssen et al.¹⁹³ untersuchten die Funktionen von eEF-1 γ näher und stellten mit Hilfe einer nicht-denaturierenden Immunpräzipitationsmethode fest, dass eEF-1 γ mit Tubulin kopräzipitiert. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass eEF-1 γ eine

hydrophobe Domäne aufweist und so mit Membran- und Zytoskelett-Strukturen in der Zelle interagiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass eEF-1 γ eine Affinität zu membranartigen Strukturen aufweist. Hierfür ist wahrscheinlich die C-terminale Domäne von eEF-1 γ zuständig, während die N-terminale Domäne für die Bindung der beta und delta- Untereinheit verantwortlich ist¹⁹⁴. Der hydrophobe Charakter, der notwendig ist, um membranäre Strukturen zu binden, wird eEF-1 γ durch mehrere Tryptophanreste und apolare Aminosäuren in der C-terminalen Region verliehen. Van Damme et al.¹⁹⁵ beschreiben, dass eEF-1 γ mit eEF-1 β einen sehr starken Komplex bildet. Der eEF-1 $\beta\gamma\delta$ Komplex wird wahrscheinlich über eEF-1 γ am ER verankert¹⁹².

Von eEF-1 γ wurde gezeigt, dass es eine Glutathion-S-transferase-Aktivität besitzt¹⁹⁴. Koonin et al.¹⁹⁴ postulieren, dass eEF-1 γ eine N-terminale Domäne aufweist, die mit der Klasse der theta Glutathion-S-transferasen verwandt ist. Diese GST-artige Domäne in eEF-1 γ ist enzymatisch aktiv und bildet Homodimere, um die GST-Aktivität auszuüben. Die GST-Aktivität könnte eine entscheidende Rolle in der Regulation der Bildung eines Komplexes aus EF-1 und aa-tRNA-Synthetasen spielen, indem sie das Gleichgewicht zwischen Glutathion, Disulfid-Glutathion, Thiolgruppen von Cysteinen und Proteindisulfidbrücken verschiebt. Bisher ist die Funktion von GST in eEF-1 γ nicht bekannt. Es könnte jedoch als Sensor dienen, der den Redoxstatus in der Zelle an die Proteinsynthese-Maschinerie weitergibt, da die Translation durch reduziertes Glutathion aktiviert, durch aktiviertes Glutathion inhibiert wird. Der Einfluss des Redoxstatus in der Zelle auf den MR wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht und wird weiter unten beschrieben (vgl. Abbildung 61).

Das monomere Protein eEF2 hat ein Molekulargewicht von etwa 93 kDa und katalysiert die Translokation der beiden tRNAs, der mRNA sowie Konformationsänderungen nach dem Peptidyltransfer am 80S-Ribosom¹⁹⁶. eEF2 ist vor allem in Regionen um den Zellkern und entlang der Mikrofilament-Bündel zu finden¹⁹⁷.

Sowohl von eEF1 α ¹⁹⁸⁻²⁰³, eEF1 β ²⁰⁴, als auch von eEF-2^{205,206} wurde eine Interaktion mit Aktin gezeigt, was einen möglichen Link zwischen der Proteinsynthese-Maschinerie und dem Zytoskelett darstellt. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse von Marchesi et al.²⁰⁷. Diese beobachteten unter Zugabe von ATP die Bildung eines Multiprotein-Komplexes aus eEF1 α , Tubulin und HSP70 bzw. ohne ATP-Zugabe aus eEF1 α , Tubulin und Aktin und postulieren einen schrittweisen Prozess der Bildung dieser beiden Komplexe. Die Kerneinheit aus Tubulin und dem eEF-1 Protein lagert sich möglicherweise zuerst zusammen, da beide offensichtlich immer in der gleichen stöchiometrischen Menge anwesend sind. Durch sekundäre Mechanismen, eventuell durch Phosphorylierung, wird eine Bindungsstelle dadurch zugänglicher entweder für HSP70 oder für Aktin. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, dass

HSP70 und Aktin trotz sehr unterschiedlicher Primärstrukturen fast identische ATP-Bindungsdomänen besitzen²⁰⁸.

Bislang wurde in der Literatur noch keine Interaktion zwischen dem MR und eEF-2 beschrieben. Einen ersten Hinweis hierauf liefern Piwien-Pilipuk et al.²⁷¹, indem sie einen Zusammenhang zwischen eEF2 und dem MR unter oxidativen Stressbedingungen herstellen: Die nukleäre Translokation des MR wird durch oxidativen Stress unterbunden. Nach Behandlung von Mäusen mit BSO (Buthioninin-(SR)-sulfoximin), welches einen Mangel an reduziertem Glutathion (GSH) induziert, wurde eine herabgesetzte Steroidbindungskapazität festgestellt, die als Folge herabgesetzter MR-Konzentrationen aufgetreten ist, nicht jedoch aufgrund eines Einflusses des GSH-Mangels auf die Bindung von MR und HSP90. Piwien-Pilipuk et al. spekulieren, dass diese erniedrigte MR Konzentration dadurch zustande kam, dass die renalen Zellen nicht mehr in der Lage waren, das reifende Protein vollständig zu synthetisieren. Dies könnte durch eine Transformation von eEF-2 erfolgt sein. Falls tatsächlich eine Beschädigung von eEF-2 eine Ursache für die niedrigen MR-Konzentrationen war, müsste das Hinzugeben von gereinigtem eEF-2 zum Transkriptions/Translations-System diesen Mangel beheben. Sie beobachteten, dass der inhibitorische Effekt, den der oxidative Stress auf die MR-Translation ausgeübt hat, unterbunden wurde, wenn eEF-2 dem Inkubationsmedium hinzugefügt wurde.

Es ist bekannt, dass eEF-2 über Phosphorylierung durch eine hoch-spezifische Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase, die so genannte eEF2-Kinase, reguliert und dadurch in seiner Aktivität inhibiert wird²⁰⁹. Wie weiter oben erwähnt wurde, konnten zahlreiche metabolische Enzyme als Interaktionspartner der Muskel-spezifischen Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase identifiziert werden. Hierdurch wird bei Interaktion des MR mit eEF-2 ein weiterer plausibler Link zwischen den putativen MR-bindenden metabolischen Proteinen über eine Interaktion mit der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase nahe gelegt.

5. Sonstige

Weiterhin wurde ein Protein aus der Calponin-Familie massenspektrometrisch identifiziert, das SM22-alpha Homolog **Transgelin-2**. Über dieses Protein ist zurzeit noch sehr wenig bekannt. Mehrere Autoren haben eine Interaktion von SM22/Transgelin mit Aktin dargestellt²¹⁰⁻²¹³. Die Bindung erfolgt wahrscheinlich über eine Aktinbindungsstelle, die vier positiv geladene Aminosäuren enthält. Dammeier et al.²¹⁴ wiesen nach, dass SM22 nach Aktivierung durch Proteinkinase C (PKC) vom Aktin-Zytoskelett dissoziiert und sich diffus im Zytoplasma verteilt. Sie spekulieren weiterhin, dass eine Phosphorylierung durch PKC die intrazelluläre Lokalisation von SM22 kontrolliert.

Eine Interaktion von Transgelin-2 mit Steroidrezeptoren ist bislang noch nicht in der Literatur erwähnt worden. Möglicherweise findet hier eine indirekte Interaktion des MR mit

Transgeline-2 über das Zytoskelett-Protein Aktin statt. In der Literatur wurden jedoch auch weitere Proteine, die wir als MR-Interaktionspartner identifizieren konnten, als interagierende Proteine von Calponin beschrieben. Hierzu gehören Tubulin^{215,216} und HSP90^{217,218}.

Ribosomales Protein RS 40K (*Laminin-Rezeptor, laminin-bindendes Protein p40, 67kDa Laminin-bindendes Protein LBP*) Laminin ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und ist in Zelladhäsion, Migration, Proliferation sowie Differenzierung involviert. Zellen interagieren mit Laminin über Rezeptoren an der Zelloberfläche; hierzu gehören sowohl Integrine als auch nicht-Integrin-Proteine wie das 67kDa LBP²¹⁹.

Bei dem Ribosomalen Protein RS 40K handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Interaktion mit dem MR, da das Ribosomale Protein sehr stark zu unspezifischer Komplexbildung neigt und daher zusammen mit sehr vielen Proteinen isoliert wird.

Es wurde ferner das Protein **14-3-3 ϵ** identifiziert. Die 14-3-3 Familie liegt in vielen Säugetierspezies hochkonserviert vor. In Säugetieren sind sieben homologe Isoformen aus der 14-3-3 Proteinfamilie bekannt: β , γ , ϵ , η , σ , τ und ζ ²²⁰. Über die Isoform 14-3-3 ϵ im Speziellen weiß man recht wenig. Eine Strukturanalyse von Variationen an der äußeren Oberfläche von 14-3-3 ϵ lassen vermuten, dass diese Isoform einen wichtigen Effekt auf die Interaktion mit anderen Proteinen hat²²¹.

14-3-3 agiert als Dimer und übt drei hauptsächliche Funktionen aus: es kann als Adaptorprotein fungieren und z.B. zur gleichen Zeit an zwei Proteine binden und diese verbinden; des Weiteren kann 14-3-3 eine Konformationsänderung im Targetprotein verursachen sowie eine spezifische Region am Targetprotein maskieren^{222,223}. Bislang sind mehr als 300 Bindungspartner von 14-3-3 Proteinen identifiziert worden, von denen die meisten zu den Phosphoproteinen zählen. Hierdurch sind 14-3-3 Proteine in die Regulation der meisten zellulären Prozesse wie verschiedenen metabolischen Wegen, Redox-Regulation, Transkription, RNA Prozessierung, Proteinsynthese, Proteinfaltung und -degradation, Zellzyklus, sowie der Organisation von Zytoskelett und zellulärem Trafficking eingebunden²²⁴. Dementsprechend beschreiben Angrand et al.²²⁵ in einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit zahlreiche mit dem Protein 14-3-3 assoziierte Proteine. Hierunter befinden sich Phosphatasen, Signalkinasen, Phosphodiesterasen, kleine GTPase verwandte Proteine, metabolische Enzyme, zum Zytoskelett gehörige Proteine, Transkriptionsfaktoren sowie Proteine, die ins zelluläre und Vesikeltrafficking eingebunden sind. Unter anderem konnte auch das Enzym Enolase als 14-3-3 Bindungspartner erfasst werden. Pozuelo Rubio et al.²²⁶ isolierten affinitätschromatographisch über 200 mit 14-3-3 interagierende Phosphoproteine, zu

denen beispielsweise einige glykolytische Enzyme, die Chaperone HSP70 und Bip/GRK78, Bestandteile des Zytoskeletts wie Aktin und Tubulin sowie die Elongationsfaktoren eEF1 γ und eEF2 gehören. Auch Jin et al.²²⁷ isolierten zahlreiche mit 14-3-3 interagierende Proteine wie eEF1, Zytoskelett-Proteine sowie Chaperone (z.B. TCP-1 beta, HSPA8). Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass 14-3-3-Proteine eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Aktin-Zytoskeletts und des zellulären Traffickings spielen²²⁸⁻²³¹. Bei dem sehr abundanten Protein GAPDH stellt sich immer die Frage, ob es sich hierbei tatsächlich um eine spezifische Interaktion handelt. Rubio et al.²²⁶ versuchten diese Frage zu klären. Weniger als 5% des Gesamt-GAPDH-Pools aus dem Gesamtzellextrakt oder aus dem Durchfluss durch die 14-3-3-Sepharose-Säule konnten durch 14-3-3-Sepharose präzipitiert werden. Hingegen waren 92% von GAPDH aus dem affinitätschromatographisch isolierten Eluat in der Lage, erneut an 14-3-3-Sepharose zu binden. Möglicherweise wurde also eine Subpopulation von GAPDH isoliert, die spezifisch an 14-3-3 Proteine bindet und in glykolytische Vorgänge in der Zelle involviert ist.

Eine Interaktion zwischen dem Mineralocorticoid-Rezeptor und dem Protein 14-3-3 ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Allerdings konnten verschiedene Isoformen von 14-3-3 als Interaktionspartner des Glucocorticoid-Rezeptors ermittelt werden^{94,95,232-234}. In einem Hefe two-hybrid Screening konnten Wakui et al.²³³ das Protein 14-3-3 η als GR-bindendes Protein nachweisen, indem sie die Liganden-bindende Domäne des GR als „bait“ verwendet haben. Die GR LBD interagiert mit 14-3-3 η nach Stimulation mit den Agonisten Dexamethason und Triamcinolon. Eine Stimulation mit dem GR-Antagonisten RU486 resultierte jedoch in einer deutlich herabgesetzten Rezeptor-Interaktion mit dem Protein 14-3-3. Zudem konnte in Glutathion-S-transferase (GST) pull-down Experimenten gezeigt werden, dass 14-3-3 η mit dem aktivierten GR interagiert, während Molybdat eine Interaktion zwischen GR und 14-3-3 verhindert. Da von RU486²³⁵ und Molybdat^{236,237} bekannt ist, dass sie beide den GR-HSP90-Komplex stabilisieren, ist zu vermuten, dass der GR zuerst von HSP 90 abdissoziieren muss, um eine Interaktion zwischen GR und 14-3-3 zu ermöglichen. Zilliacus et al.²³⁴ überprüften in GST-pull-down Experimenten, ob 14-3-3 neben dem GR auch mit anderen Steroidrezeptoren interagiert. GST-14-3-3 interagiert *in vitro* mit dem translatierten GR, AR, ER α , ER β , and TR α , aber nicht mit dem Retinoid X Rezeptor α (RXR) oder PPAR. Die Interaktion zwischen GR und 14-3-3 wurde hier ebenfalls durch Molybdat gehemmt, nicht aber die Interaktion zwischen 14-3-3 und den Steroidrezeptoren AR und ER. Kim und Kollegen²³⁸ bestätigten eine Interaktion zwischen GR und Protein 14-3-3 und führten den Nachweis, dass 14-3-3 η als positiver Regulator für die transkriptionelle Aktivierung des GR fungiert, indem es die Degradation des GR hemmt.

Aufgrund von Studien zum Glucocorticoid-Rezeptor erscheint eine Interaktion von 14-3-3 mit dem MR sehr wahrscheinlich. 14-3-3 Proteine binden fast ausschließlich an

phosphorylierte Proteine. Auch vom MR wurde gezeigt, dass er phosphoryliert wird, die Domänen für die Phosphorylierung sind jedoch noch nicht bekannt²³⁹. Ob es sich hierbei tatsächlich wie beim GR um eine direkte Interaktion handelt, bleibt allerdings in weiterführenden Versuchen abzuklären. Da zahlreiche der isolierten putativen MR-bindenden Proteine ebenfalls in Komplexen mit dem Protein 14-3-3 gefunden wurden, besteht die Möglichkeit, dass der MR indirekt, z.B. über Proteine des Zytoskeletts an 14-3-3 bindet. Ein weiteres Beispiel hierfür ist eine Studie zu Interaktionspartnern des Chlorid intrazellulären Kanalproteins CLIC 4 (p64H1). Sugantha et al.²⁴⁰ identifizierten Kreatinkinase, Protein 14-3-3, beta-Aktin, alpha-Tubulin und Dynamin als CLIC 4 bindende Proteine.

Von vielen der isolierten Proteine ist in der Literatur eine Interaktion mit Aktin beschrieben worden. Möglicherweise interagieren diese Proteine indirekt über Proteine des Zytoskeletts mit dem Mineralocorticoid-Rezeptor. Auf der anderen Seite könnte es sich hierbei aber auch lediglich um unspezifische Bindungen handeln. In wie weit es sich bei diesen Proteinen tatsächlich um direkte oder indirekte Interaktionspartner des MR handelt, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Differentiell rekrutierte Proteine im MR-Komplex nach Stimulation mit MR-Liganden:

Der MR kann in verschiedenen Zuständen existieren. Im Zytoplasma liegt er in einem inaktiven, an Hitzeschockproteine gebundenen Zustand vor. Nach der Aktivierung durch die Bindung eines Liganden dissoziieren die Hitzeschockproteine und der gebundene Rezeptor wandert in den Zellkern (Transferzustand). Im Zellkern bindet der MR schließlich an DNA und wirkt als Transkriptionsfaktor. In jedem dieser drei Zustände ist die Zusammenstellung des so genannten „Interactoms“, d.h. der mit dem MR wechselwirkenden Proteine, verschieden. Die Zusammensetzung dieses Interactoms differiert sehr wahrscheinlich auch in Abhängigkeit vom gebundenen Liganden.

Am Beispiel des Estrogen- und des Glucocorticoid-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass Agonisten an ihrem Rezeptor nicht zwangsläufig immer die gleiche qualitative Wirkung ausüben. Diese ungleichen Wirkungsmuster von Agonisten sind in der selektiven Rekrutierung von Kofaktoren begründet. Die Glucocorticoide Dexamethason und Betamethason, beispielsweise, werden aufgrund ihres unterschiedlichen Wirkungsprofils auch in der Therapie verschieden eingesetzt. Während Betamethason hauptsächlich als Externum Verwendung findet, wird Dexamethason hingegen innerlich angewendet. Ein weiteres Beispiel liefern Untersuchungen zum Estrogen-Rezeptor. Der selektive Estrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) Raloxifen weist sowohl an Brust- als auch an Endometriumzellen ausschließlich ER-antagonistische Wirkungen auf. Tamoxifen hingegen wirkte zwar in Brustzellen als Antagonist, im Endometrium aber als Agonist für

die Expression der Wachstumsregulatoren c-Myc und IGF-1. Während SRC-1 als Koaktivator für Tamoxifen wirkte, rekrutierte Raloxifen diesen Kofaktor nicht²⁴¹. Der Grund für dieses differierende Verhalten liegt demnach ebenfalls in der selektiven Rekrutierung von Kofaktoren.

Aus diesem Grund sollten Proteine identifiziert werden, die in Abhängigkeit von der Identität des gebundenen Liganden differentiell an den MR binden und somit z.B. Unterschiede in der Wirkung von Aldosteron und Cortisol auf die MR-vermittelte Genexpression erklären können.

MR überexprimierende HEK293T-Zellen wurden jeweils für fünf Minuten bei 37°C mit 10nM Aldosteron oder mit 100nM Spironolacton, einer auch therapeutisch erreichbaren Konzentration, stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte (EtOH-behandelte) MR-überexprimierende Zellen sowie mit leerem Expressionsvektor transfizierte Zellen mitgeführt. Der Mineralocorticoid-Rezeptor wurde zusammen mit seinen interagierenden Proteinen über Strep-Tactin-Säulen aufgereinigt. Jeweils 20µl der aufkonzentrierten Proteinlösungen wurden über ein SDS-Acrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Dieses Gel ist in Abbildung 57 dargestellt.

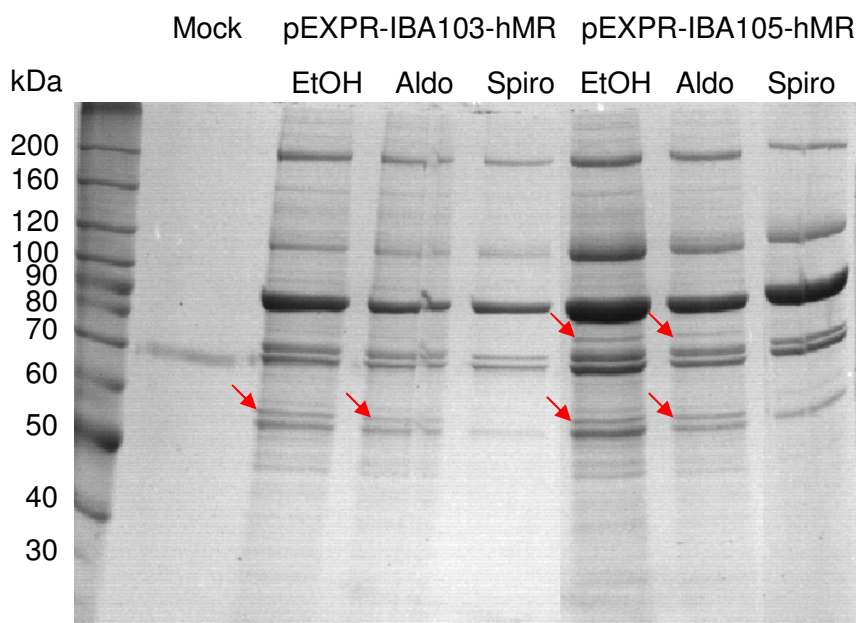


Abbildung 57 Isolierung des C- und N-terminal mit dem Strep-Tag fusionierten MR und potentieller interagierender Proteine nach Stimulation mit Aldosteron oder Spironolacton. HEK293T-Zellen wurden jeweils 5 Minuten mit 10nM Aldosteron, 100nM Spironolacton oder mit Ethanol inkubiert. Die isolierten Proteine wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. *EtOH* 0,0001% Ethanol *Aldo* 10nM Aldosteron *Spiro* 100nM Spironolacton *Mock* mit leerem Vektor transfiziert

Der Einsatz von Antagonisten ist eine übliche Methode, um die Genregulation durch Steroidrezeptoren zu untersuchen. Spironolacton ist ein nicht-selektiver Mineralocorticoid-Rezeptor Antagonist, der ebenfalls Affinität zum Progesteron- und Androgenrezeptor aufweist. Zur nächsten Generation der Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten gehört der selektivere Wirkstoff Eplerenon. Anti-Mineralocorticoide binden mit hoher Affinität an den MR, dissoziieren aber deutlich schneller als Aldosteron und können den HSP90-MR-Komplex destabilisieren^{242,243}. Nach Bindung des Antagonisten interagiert der Rezeptor mit HREs, was aber nicht zu einer effizienten Aktivierung der Transkription führt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Bindung von Agonisten oder Antagonisten sehr wahrscheinlich in unterschiedlichen Konformationsänderungen des Rezeptors resultiert^{244,245}, die wiederum Protein-Protein-Interaktionen modulieren können und so mit verschiedenen Koregulatoren assoziieren.

Ein Beispiel hierfür ist die sowohl reno- als auch kardioprotektive Wirkung von Spirolactonen. Die Mechanismen hierfür sind zwar noch nicht hinreichend geklärt. Sicherlich spielt aber eine antiinflammatorische Wirkung, die der proinflammatorischen Wirkung von Aldosteron entgegenwirkt, eine entscheidende Rolle²⁴⁶⁻²⁴⁸. Neben der Eigenschaft von Spirolactonen als kompetitive Antagonisten gegen Aldosteron müssen noch weitere Wirkungskomponenten zu dieser entzündungshemmenden Wirkung beitragen, da eine antiinflammatorische Wirkung von Spironolacton ebenfalls bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen beobachtet werden konnte²⁴⁹. Spironolacton zeigt diese Wirkung demnach auch dann, wenn kein erhöhter Aldosteronspiegel vorliegt und das Immunsystem durch andere Stimuli aktiviert ist. Entweder resultieren diese Beobachtungen aus einer Wirkung von Spironolacton, die völlig unabhängig vom Mineralocorticoid-Rezeptor erfolgt²⁵⁰; oder diese Aldosteron-unabhängigen Effekte sind Folge einer durch den Liganden ausgelösten Konformationsänderung des Rezeptors und einer Wechselwirkung mit differentiell rekrutierten Kofaktoren.

Spironolacton weist neben seiner Wirkung als MR-Antagonist zusätzlich auch agonistische Aktivität auf²⁵¹⁻²⁵³. Massaad et al.²⁵¹ konnten zeigen, dass Spironolacton in verschiedenen Zelllinien partielle agonistische Aktivitäten aufweist. Spironolacton bewirkte sowohl in MR-überexprimierenden H5- als auch in HepG2-Zellen eine Aktivierung des MMTV-Promotors. Hingegen wiesen weder CV1 noch COS-1 Zellen eine agonistische Aktivität auf. Zudem konnten Massaad et al. darlegen, dass die partielle agonistische Aktivität von Spironolacton Promotor-abhängig ist.

Bei Betrachten des Proteingels in Abbildung 57 konnten zwei Proteine festgestellt werden, die zwar nach einer Inkubation von MR-überexprimierenden HEK293T-Zellen mit Ethanol und Aldosteron zusammen mit dem MR isoliert worden waren, nicht aber nach einer Stimulation mit Spironolacton (rote Markierungen). Diese Banden wurden im Anschluss im MALDI-Verfahren identifiziert.

Bei dem ersten der beiden Proteine handelte es sich um das **β -Propionyl-CoA-Carboxylase Vorläuferprotein (pPCC β)**. Die Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC) ist ein Biotin-abhängiges mitochondriales Enzym, das die Umwandlung von Propionyl-CoA zu D-methylmalonyl-CoA katalysiert (s. Abbildung 58), einem entscheidenden Schritt in der Oxidation von Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen sowie für die Aminosäuren Isoleucin, Threonin, Methionin und Valin^{254,255}.

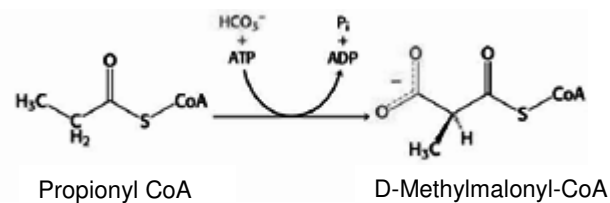


Abbildung 58 Funktion von Propionyl-CoA-Carboxylase. Carboxylierung von Propionyl-CoA zu D-Methylmalonyl-CoA in der Fettsäureoxidation

PCC besteht aus den zwei nicht-identischen Untereinheiten α (72kDa) und β (56kDa), die als Oligomer $\alpha_4\beta_4$ vorliegen²⁵⁶. PCC wird neben der Niere ebenfalls in Leber und Dünndarm exprimiert und ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. pPCC β wird an zytoplasmatischen Polyribosomen synthetisiert und anschließend mittels eines spezifischen Transporters zu den Mitochondrien transferiert. Die β -Untereinheit wird als Precursor hergestellt, der etwa 7500 Dalton größer ist als das reife mitochondriale Pendant. Nach Erreichen der mitochondrialen Matrix wird pPCC β durch eine Zn²⁺-abhängige Protease in der Matrix zur reifen β -Untereinheit bearbeitet²⁵⁷. In Untersuchungen von Shiraishi et al.²⁵⁸ interagierte pPCC β mit dem Enzym Glukokinase und erhöhte dessen Enzym-Aktivität, so dass pPCC β möglicherweise eine Rolle für den Glukose-Metabolismus in der Zelle einnimmt.

Eine Interaktion von PCC mit Steroidrezeptoren ist bisher noch nicht beschrieben worden. Da es sich bei PCC um ein Biotin-abhängiges Protein handelt, könnte man eine unspezifische Bindung an Strep-Tactin vermuten. Andererseits erfolgt die Biotinylierung von PCC ausschließlich an der α -Untereinheit²⁵⁶, isoliert wurde hingegen die β -Untereinheit; trotzdem kann eine unspezifische Bindung nicht völlig ausgeschlossen werden, da unter Umständen der biotinylierte Komplex aus α - und β -Untereinheit an die

Säulenmatrix gebunden hat. Dem widerspricht allerdings die Tatsache, dass PCC β abhängig vom eingesetzten Liganden identifiziert wurde.

Es stellt sich weiterhin die Frage, ob es sich bei einem mitochondrialen Protein um einen physiologisch relevanten Interaktionspartner eines Steroidrezeptors handeln kann. Der MR existiert in drei verschiedenen Zuständen: einem zytosolischen, nicht an Ligand gebundenen „Ruhezustand“, einem „Transferzustand“ nach der Bindung von Ligand auf dem Weg in den Zellkern sowie einem aktivierten Zustand, in dem der MR als Bestandteil des Transkriptionskomplexes im Zellkern an DNA gebunden ist. Bislang wurde noch kein mitochondriales Vorkommen des MR beschrieben, obgleich die meisten Steroidrezeptoren (ER²⁵⁹⁻²⁶¹, AR²⁶², TR^{263,264}, GR^{265,264}) in Mitochondrien nachgewiesen werden konnten. In zukünftigen Arbeiten soll daher die subzelluläre Verteilung des MR mittels Fraktionierung und Nachweis mit Kompartiment-spezifischen Antikörpern überprüft werden.

Das zweite der differentiell rekrutierten Proteine ist **GRP78** (*glucose-regulated protein, dnaK type molecular chaperone HSPA5 precursor, Heat shock 70 kDa protein 5, Immunoglobulin heavy chain-binding protein, BiP, Endoplasmic reticulum lumenal Ca(2+)-binding protein grp78*). Das Chaperon GRP78 ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Es wird vermutet, dass GRP78 für die korrekte Faltung und Gruppierung von Proteinen in der frühen Phase der Proteinprozessierung sowie für das Zurückhalten falsch gefalteter Proteine im ER Lumen verantwortlich ist²⁶⁶. Vogel et al.²⁶⁷ spekulieren aufgrund von Versuchen mit dem Hefe-Homolog KAR2, dass GRP78 des Weiteren für die kotranslationale Translokation reifender Polypeptide vom Zytosol ins ER verantwortlich ist. Möglicherweise spielen posttranslationale Modifikationen eine große Rolle für die Regulation von Synthese und Bindung von GRP78. Hendershot et al.²⁶⁸ beschreiben posttranslationale Modifikationen von GRP78 in Form von Phosphorylierungen und mono-ADP-Ribosylierung. Laitusis et al.²⁶⁶ vermuten, dass das ADP-ribosylierte GRP78 ein Puffersystem liefert, wodurch die Raten von Protein-Prozessierung und Protein-Synthese ausbalanciert werden. In Zellen mit hohen Proteinsynthese-Raten würde demnach unmodifiziertes GRP78 mit Zwischenstufen der Proteinfaltung komplexieren. Jede Verlangsamung der Proteinsynthese im Vergleich zur Protein-Prozessierung würde zu einer Inaktivierung von GRP78 durch ADP-Ribosylierung führen.

Über eine Interaktion von GRP78 mit dem Mineralocorticoid-Rezeptor wurde bislang noch nicht berichtet. Hinweise darauf liefern aber Studien zum GR. Wikström et al.⁹⁴ identifizierten das verwandte *DNA/K-type molecular chaperone grp75 precursor* als Teil des GR Multiproteinkomplexes. Hutchison und Kollegen²⁶⁹ stellten ebenfalls eine Bindung zwischen GR und GRP78 fest. Sie untersuchten die Wirkung vier verschiedener Proteine der HSP70-Familie auf die Formierung des GR-HSP90-Heterokomplexes in einem

HSP70-freiem Retikulozyten-Lysat. Im Gegensatz zu HSP70, welches die Bildung des GR-HSP90-Komplexes förderte, hemmte BiP den Zusammenschluss des Heterokomplexes. Überdies wurde kürzlich eine Interaktion zwischen GRP78 und dem Estrogen-Rezeptor entdeckt²⁷⁰.

Da nach einer Stimulation mit Spironolacton zwei differentiell rekrutierte Proteine identifiziert werden konnten, wurde eine weitere Versuchsreihe mit unterschiedlichen MR-Antagonisten durchgeführt, um deren Wirkung auf die Kofaktor-Rekrutierung zu untersuchen. Im Zusammenhang mit einem anderen Projekt unserer Arbeitsgruppe wurden Derivate von Spironolacton und Canrenon synthetisiert, z.B. RU26752 (7 α -Propyl-6,7-dihydrocanrenon), welches kommerziell nicht erhältlich ist. Es erfolgte eine Stimulation von MR-überexprimierenden HEK293T-Zellen mit den Inhibitoren Spironolacton, Eplerenon, Canrenon und RU26752 in einer Konzentration von jeweils 100nM und einer Inkubationsdauer von 5 Minuten. Nach Aufreinigung über Strep-Tactin-Affinitätssäulen und Auftrennung über eindimensionale SDS-Gele konnten jedoch im Vergleich zu den mit Spironolacton stimulierten Zellen keine weiteren differentiell rekrutierten Proteine festgestellt werden.

Aktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors durch Cortisol

Der Mineralocorticoid-Rezeptor weist, wie in Kap.1.3.2.2. beschrieben, eine höhere Affinität für Cortisol als für Aldosteron auf. Unter physiologischen Bedingungen findet man die Glucocorticoide Cortisol und Cortison jedoch in etwa hundertfach höheren Konzentrationen im Plasma als Aldosteron. In epithelialen Geweben wird der MR zusammen mit dem Enzym 11 β -HSD2 koexprimiert. Damit der MR nicht von endogenen Glucocorticoiden überschwemmt wird, wird Cortisol unter physiologischen Bedingungen durch die 11 β -HSD2 zum 11-Keto-Produkt Cortison abgebaut, welches nur noch eine geringe Affinität zum MR besitzt. Die intrazellulären Glucocorticoid-Konzentrationen werden hierdurch von einem 100-fachen Überschuss gegenüber Aldosteron etwa auf den Faktor 10 reduziert (vgl. Abbildung 10, Kap. 1.3.2.2). Dementsprechend wird der MR auch in epithelialen Geweben, in denen er durch die 11 β -HSD2 geschützt wird, noch durch Glucocorticoide besetzt, jedoch nicht aktiviert. Wenn ein Mangel an 11 β -HSD2 vorliegt oder das Enzym durch Carbenoxolon inhibiert wird, wird der Glucocorticoid-MR-Komplex aktiviert. Mihailidou und Funder²⁷ erklären dies nicht mit einer verstärkten Besetzung von MRs mit Cortisol, sondern als Folge herabgesetzter NADH-Konzentrationen und einem dadurch veränderten Redoxstatus in der Zelle, was möglicherweise die Aktivierung anderer Kofaktoren bedingt. In Messungen des Kurzschlussstroms zeigte Cortisol in Kardiomyocyten alleine keinen Effekt, konnte jedoch in Gegenwart von 10nM Aldosteron den Aldosteroneffekt auf etwa 10% reduzieren. In Gegenwart von 5mM oxidiertem

Glutathion (GSSG) veränderte Cortisol sein Wirkungsprofil hingegen vom MR-Antagonisten zum Agonisten, indem es einen vergleichbaren Effekt wie Aldosteron zeigte. Auch Piwien-Pilipuk et al.²⁷¹ spekulieren, dass die Interaktion zwischen Aldosteron und dem Mineralocorticoid-Rezeptor vom jeweiligen Redoxstatus abhängig ist. Infolge eines durch BSO induzierten Glutathion-Mangels in der Zelle sank die Expression des MR deutlich. Obwohl das oxidierte MR Protein kein Steroid mehr bindet, soll es gegenüber thermischem Abbau stabiler sein als seine reduzierte Form. Galigniana berichtet, dass die MR-Translokation in den Zellkern durch oxidativen Stress außer Kraft gesetzt wird²⁷².

Im Folgenden sollte daher zum einen untersucht werden, ob sich die Rekrutierung von Kofaktoren nach Stimulation mit Cortisol von der nach einer Behandlung mit Aldosteron unterscheidet. Zum anderen stellte sich die Frage nach einem möglichen Einfluss des Redoxstatus auf die Interaktion mit Koregulatoren.

Um die eben genannten Fragen zu beantworten, wurden HEK293T-Zellen vor der Ernte und Isolierung des MR mit Cortisol stimuliert. HEK293T exprimieren keine signifikanten Mengen an 11 β -HSD2. Um jeglichen Einfluss eventuell vorhandener 11 β -HSD2 ausschließen zu können, wurde zusätzlich mit dem 11 β -HSD2-Inhibitor Carbenoxolon inkubiert. Daneben wurden der Effekt von Cortisol und Carbenoxolon, sowie ein möglicher Einfluss des Redoxstatus auf die transkriptionelle Aktivierung des MR untersucht.

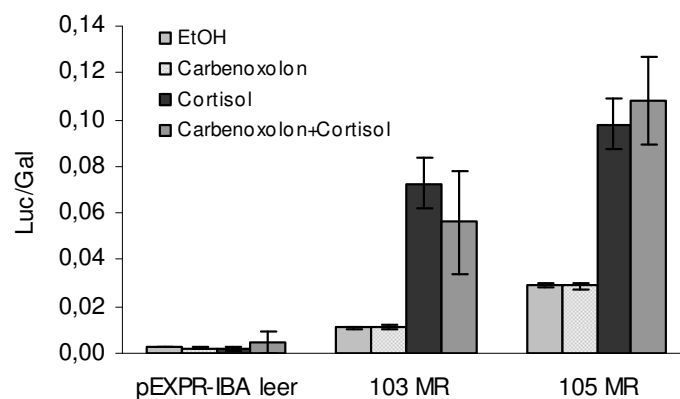


Abbildung 59 Transaktivierung des N- und C-terminal Strep-Tag fusionierten MR durch Cortisol. HEK293T-Zellen wurden mit dem leerem pEXPR-IBA Expressionsvektor oder dem N- bzw. C-terminal fusioniertem MR-Fusionskonstrukt transfiziert. Die Zellen wurden mit 10nM Cortisol, 1 μ M Carbenoxolon, Cortisol plus Carbenoxolon oder nur mit Ethanol stimuliert.

Nach Stimulation mit 10nM Cortisol war sowohl beim N-terminal als auch beim C-terminal verbundenen StrepTag-MR-Fusionskonstrukt ein deutlicher Anstieg der Reporterogenaktivität im Vergleich zum leeren Expressionsvektor zu beobachten (s. Abbildung 59). Eine Stimulation mit 1 μ M Carbenoxolon alleine hatte gegenüber der unstimulierten (Ethanol) Kontrolle erwartungsgemäß keinen Anstieg in der Reporterogenaktivität zur

Folge. Ebenso hatte Carbenoxolon keinen Effekt auf die Aktivierung des MR durch Cortisol, was die Tatsache widerspiegelt, dass die 11 β -HSD2 in keinen signifikanten Mengen in HEK293T-Zellen vorhanden ist.

Zur Isolierung des Mineralocorticoid-Rezeptors wurden HEK293T-Zellen transient mit dem StrepTag-MR-Fusionsplasmid transfiziert und vor der Ernte 5 Minuten bei 37°C mit 10nM Cortisol stimuliert. Daneben erfolgte vor der eigentlichen Stimulation mit Cortisol eine Vorinkubation mit dem 11 β -HSD2-Inhibitor Carbenoxolon. Hierfür wurden die Zellen im Anschluss an die 15-minütige Vorinkubation mit 1 μ M Carbenoxolon bei 37°C einer Stimulation mit 10nM Cortisol für 5 Minuten bei 37°C unterzogen. Außerdem wurden Zellen in einem weiteren Versuchsansatz ausschließlich mit Carbenoxolon inkubiert, um einen alleinigen Effekt des 11 β -HSD2-Inhibitors ausschließen zu können.

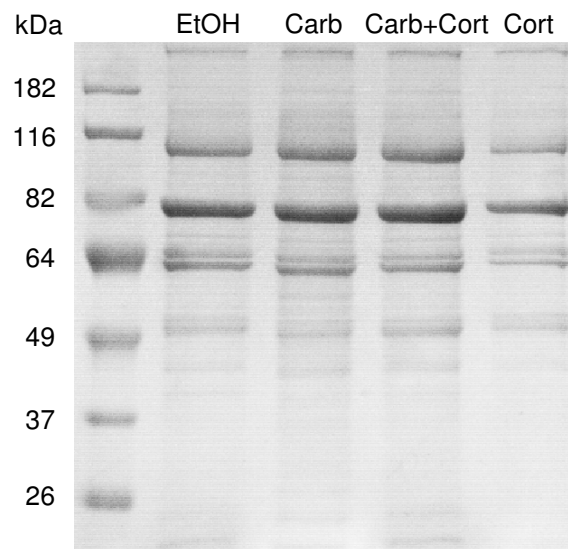


Abbildung 60 Auftrennung des isolierten N-terminal mit dem Strep-Tag fusionierten MR und potentieller interagierender Proteine nach Stimulation mit Carbenoxolon, Cortisol, Carbenoxolon plus Cortisol oder Ethanol in einer 1D-Gelelektrophorese. *EtOH* Ethanol, *Carb* 1 μ M Carbenoxolon, *Cort* 10nM Cortisol

Eine Stimulation mit Cortisol führte unter diesen Versuchsbedingungen nicht zu einer differentiellen Rekrutierung von interagierenden Proteinen im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen (vgl. Abbildung 60). Auch Carbenoxolon übte keinerlei Einfluss aus; diese Beobachtung entsprach jedoch den Erwartungen, da HEK293T-Zellen sehr wahrscheinlich keine 11 β -HSD2 exprimieren, was die Ergebnisse des Transaktivierungsassays bestätigten.

Um einen möglichen Einfluss des Redoxstatus auf die Expression und Funktionalität des MR zu überprüfen, wurden Transkriptionsassays durchgeführt. Hierfür wurde ein MR-Expressionsplasmid (pEXPR-IBA105-hMR) in HEK293T-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden entweder mit 1nM Aldosteron oder 10nM Spironolacton mit oder ohne Zusatz von

5mM oxidiertem Glutathion stimuliert und nach 24-stündiger Inkubation geerntet. Im Anschluss wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Die Werte aus diesen Messungen wurden mit den Ergebnissen aus einem parallel durchgeführten Galaktosidase-Assay aus denselben Proben normiert.

Cortisol erzeugte im Luciferase-Assay eine deutliche transkriptionelle Aktivierung, die durch eine Koinkubation mit Carbenoxolon nicht beeinflusst wurde. Carbenoxolon alleine zeigte keine Wirkung. Eine Koinkubation mit 5mM Glutathion (GSSG) übte in diesen Versuchen keinerlei Effekt auf die beobachteten transkriptionellen Aktivierungen aus (s. Abbildung 61). Durch Inkubation mit Aldosteron wurde der MR etwa um den Faktor 2 aktiviert.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der durchgeführten Reporteragen-Assays nicht auf einen Einfluss des Redoxstatus auf die transkriptionelle Aktivierung des MR in HEK293T-Zellen schließen.

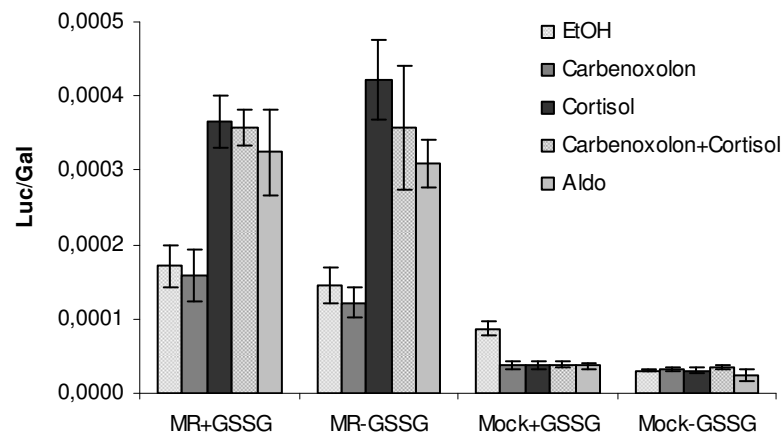


Abbildung 61 Einfluss des Redoxstatus in der Zelle auf die Transaktivierung des MR durch Cortisol und Aldosteron. HEK293T-Zellen wurden mit dem MR Expressionsplasmid pEXPR-IBA105-MR transfiziert und 24 Stunden mit dem jeweiligen Stimulus mit oder ohne Zugabe von 5mM Glutathion (GSSG) inkubiert. Als Stimuli wurden 1µM Carbenoxolon, 10nM Cortisol, Carbenoxolon plus Cortisol, Ethanol oder 1nM Aldosteron eingesetzt. *Mock* mit leerem Vektor transfizierte Kontroll-Zellen

Bei der Wahl der Versuchsbedingungen orientierten wir uns an den von Mihailidou und Funder durchgeführten Experimenten²⁷³. Diese verwendeten 5mM oxidiertes Glutathion, um durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) induzierte Veränderungen im Redoxstatus nachzuahmen. Mihailidou et al. applizierten GSSG allerdings über eine Patch-clamp-Pipette in die Zellen. Da GSSG wenig membrangängig ist, könnte der unterschiedliche Versuchsaufbau die differierenden Ergebnisse erklären. Andererseits wiederholten wir den Versuch mit dem membrangängigen Bis-(hydroxyethyl)disulfid (DeStreak-Reagenz,

5mM) und konnten auch mit diesem Reagenz keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung des MR beobachten.

4.2.5 Proteasomaler Abbau des MR

Ein großer Teil der Proteine wird bei Eukaryoten nach Ubiquitinierung durch das 26S-Proteasom abgebaut. Auch für Steroidrezeptoren wird ein solcher Abbau postuliert. Für Estrogen- und Glucocorticoidrezeptor konnte bereits ein derartiger proteolytischer Abbaumechanismus nachgewiesen werden. Unsere Überexpressionsversuche hatten gezeigt, dass der MR relativ schlecht exprimiert wird. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass dies zum Teil durch einen proteasomalen Abbau bedingt sein könnte.

Das 26S-Proteasom setzt sich aus zwei Teilkomponenten zusammen: einem zylindrischen, proteolytischen Kernpartikel, dem 20S-Proteasom, und einem 19S-Partikel, der an einem oder beiden Enden kappenartig auf dem 20S-Ribosom aufsitzt und ubiquitinierte Proteine erkennt²⁷⁴. Das Proteasom ist ein Enzymkomplex, dem hauptsächlich drei katalytische Aktivitäten zueigen sind: eine Chymotrypsin-artige, eine Trypsin-artige und eine Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierende Aktivität²⁷⁵.

Ein möglicher proteasomaler Abbau des MR wurde mit Hilfe des Proteasom-Inhibitors Epoxomicin überprüft. Das Epoxyketon Epoxomicin hemmt irreversibel die chymotryptische Aktivität des Proteasoms, indem es kovalent an die katalytische Einheit des 20S-Proteasoms bindet und diese inhibiert^{276,277}.

24 Stunden nach der Transfektion des humanen MR-Expressionsplasmids phMR3750 (Wildtyp hMR, keine Affinitätssequenz) in HEK293T-Zellen, wurden die Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen (10µM, 1µM, 100nM, 10nM in DMSO) inkubiert. Parallel wurden entsprechende Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und die gebildete Proteinmenge des Mineralocorticoid-Rezeptors im Western-Blot bestimmt.

Wie Abbildung 62 zeigt, wirkten in mit humanem Mineralocorticoid-Rezeptor transfizierten HEK293T-Zellen Konzentrationen des Proteasom-Inhibitors von 1 und 10µM (in 1% DMSO) bereits toxisch auf die Zellen, was aus der herabgesetzten Gesamt-Proteinmenge im Eluat zu erkennen war. Bei niedrigeren eingesetzten Konzentrationen von 10 und 100nM (in 0,01% DMSO) war hingegen keine Zunahme der Proteinmenge des Mineralocorticoid-Rezeptors festzustellen. Auch in einer weiteren Versuchsreihe mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (100nM, 1µM in 1% DMSO) konnte kein Anstieg in der Proteinmenge des MR beobachtet werden.

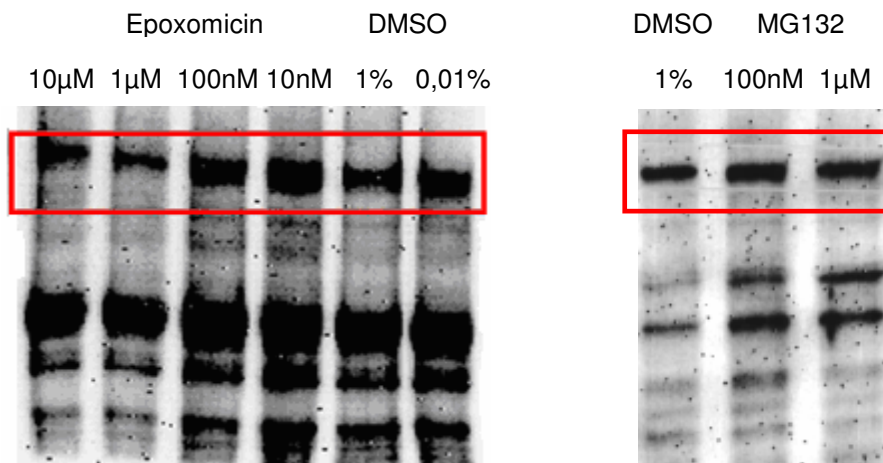


Abbildung 62 Proteasomale Hemmung des MR Abbaus. HEK293T-Zellen wurden transient mit dem MR Expressionsvektor phMR3750 transfiziert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen **(a)** Epoxomicin (10nM, 100nM, 1µM, 10µM in DMSO) oder **(b)** MG132 (100nM, 1µM) behandelt. Es wurde das Gesamtzelllysät gewonnen und mit SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Western-Blot wurde mit anti-MR-1-18 6G1 (1:100) Erst- und Rabbit-anti-mouse-HRP (1:2000) Zweitantikörper detektiert.

Im nächsten Schritt sollte in Reporteragen-Assays untersucht werden, wie und ob eine proteasomale Hemmung die Transaktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors verstärkt. Hierfür wurde das Plasmid phMR3750 zusammen mit MMTV-Luc und β -SV-Gal in HEK293T-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden entweder mit 1nM Aldosteron oder als Kontrollreaktion mit Ethanol stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit Epoxomicin oder zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und am darauf folgenden Tag geerntet. Es wurde ein Luciferase- sowie parallel aus den gleichen Proben ein Galaktosidase-Assay durchgeführt. Die ermittelten Werte aus der Luciferase-Messung wurden mit den Daten aus dem Galaktosidase-Assay normiert.

Abbildung 63 zeigt die Auswertung dieses Versuches. Die Induktion der Reporter-Aktivität durch den Mineralocorticoid-Rezeptor stieg nach Stimulation mit Aldosteron signifikant an. Eine Vorbehandlung mit Epoxomicin scheint jedoch, entgegen den Untersuchungen von Yokota et al.³⁶, die die Proteasom-Inhibitoren ALLnL und MG132 verwendeten, keinen Einfluss auf die Transaktivierung des MR zu haben.

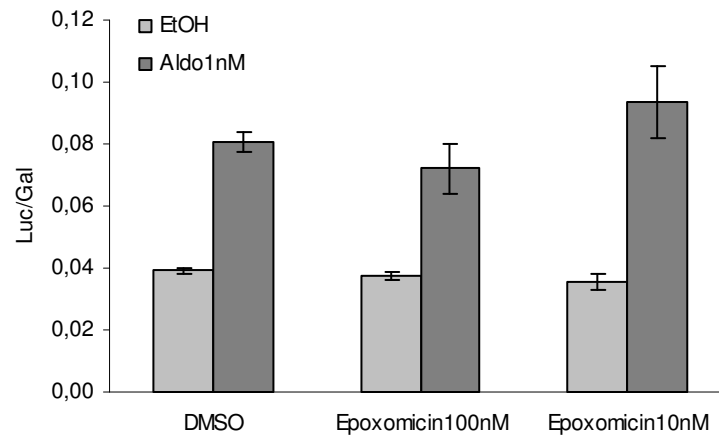


Abbildung 63 Proteasomale Hemmung des MR, Transaktivierungsassay HEK293T-Zellen wurden transient mit dem MR Expressionsvektor pHMR3750 transfiziert. Die Zellen wurden mit 10nM und 100nM Epoxomicin behandelt. Gleichzeitig wurden die Zellen mit 1nM Aldosteron stimuliert.

Der Mineralocorticoid-Rezeptor besitzt so genannte PEST-Motive in der N-terminalen Domäne (vgl. Abbildung 12). Hierbei handelt es sich um Sequenzabschnitte mit einer Länge von mindestens 12 Aminosäuren, die reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind und die im Allgemeinen als proteolytische Signale dienen²⁷⁸. Es war daher auch ein proteasomaler Abbau des MR zu vermuten. Mittels des eingesetzten Proteasom-Inhibitors Epoxomicin konnte jedoch kein proteasomaler Abbau des MR festgestellt werden.

In den durchgeführten Überexpressionsversuchen konnte zum einen beobachtet werden, dass die hergestellten MR-Fusionskonstrukte deutlich besser exprimiert wurden als der Wildtyp-MR. Zum anderen wurde der N-terminal mit dem Strep-Tag fusionierte MR (pEXPR-IBA105-MR) deutlich besser exprimiert als das entsprechende C-terminale Fusionskonstrukt (pEXPR-IBA103-MR) (vgl. Abbildung 59). Dies widerspricht ebenfalls der Hypothese eines proteasomalen Abbaus, da die PEST-Sequenzen in der NTD liegen, ein modifizierter N-Terminus (N-terminales Konstrukt) im Gegensatz zum nativen N-terminus (C-terminales Konstrukt) aber offensichtlich für den Abbau des MR hinderlich zu sein scheint.

4.2.6 Diskussion und Ausblick

Mineralocorticoid- und Glucocorticoid-Rezeptor können beide sowohl durch Glucocorticoide als auch durch Mineralocorticoide aktiviert werden. Sie binden an gemeinsame responsive Elemente am Promotor des Zielgens und können auch mit identischen Koregulatoren aus der p160-Steroid Rezeptor-Koaktivator 1 Familie und dem cAMP Response Element (CREB)-bindendem Protein (CBP)/p300 interagieren. Dies führt zur Rekrutierung der allgemeinen Transkriptions-Maschinerie und damit zur Genexpression³¹². Trotz alledem weist Aldosteron über den MR verschiedene und spezifische Wirkungen auf, die sich von denen am GR unterscheiden. Die 11 β -HSD2 trägt zur Selektivität bei, kann aber nicht alle MR-Wirkungen ausreichend erklären. Diese unterschiedlichen Effekte des GR und MR liegen möglicherweise in der differentiellen Rekrutierung spezifischer Koregulatoren begründet, die dann unterschiedliche aktive transkriptionelle Komplexe mobilisieren³¹².

Liganden induzieren am Rezeptor unterschiedliche Konformationsänderungen, die wiederum die differentielle Rekrutierung von Kofaktoren nach sich ziehen können. Die Liganden-bindende Domäne (LBD) nukleärer Rezeptoren enthält eine Liganden-abhängige Aktivierungsdomäne. Mit Agonisten besetzte nukleäre Rezeptoren rekrutieren Koaktivator-Proteine, um die Transkription zu erhöhen²⁷⁹. Diese Koaktivatoren interagieren mit nukleären Rezeptoren über kleine peptidische Motive, so genannte NR (nukleärer Rezeptor)-Boxen, die ein LXXLL Motiv (L ist Leucin, X beliebig) in einer α -helikalen Struktur enthalten und an die Bindungstasche des Koaktivators binden, die durch die Helices 2-4 und 12 der Liganden-bindenden Domäne (LBD) gebildet wird^{280,281}. Einige dieser Proteine sind bereits identifiziert worden. Zu diesen gehören unter anderem Proteine aus der p160 Familie wie SRC1 (*steroid receptor coactivator 1*) und GRIP 1 (*GR-interacting protein*), von denen in einem Yeast-two hybrid Assay gezeigt werden konnte, dass sie beide in einer agonistischen Art und Weise auch mit dem MR interagieren²⁸².

Wie neueste Studien belegen, werden nicht alle Wirkungen des Mineralocorticoid-Rezeptors ausschließlich über seinen Liganden Aldosteron vermittelt. Obwohl es unwahrscheinlich erscheint, dass Angiotensin II zellgängig ist, konnten zum Beispiel kürzlich direkte Wirkungen von Angiotensin II am MR nachgewiesen werden^{283,284}. Diese Ergebnisse werfen wiederum die Frage nach den Interaktionspartnern des MR auf. Im Gegensatz zu anderen Steroidrezeptoren, wie z.B. dem Glucocorticoid-Rezeptor, ist bisher über interagierende Proteine des Mineralocorticoid-Rezeptors noch sehr wenig bekannt. Dies beruht zum einen auf seiner, im Vergleich zu anderen Steroidrezeptoren, deutlich geringeren Expression. Zum anderen existieren keine ausreichend guten, allgemein zugänglichen Antikörper, die eine Immunpräzipitation in ausreichender Menge ermöglichen würden.

Mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems konnten Lombés et al. kürzlich eine spezifische Interaktion zwischen dem Elongationsfaktor ELL und dem humanen Mineralocorticoid-Rezeptor nachweisen²⁸⁵. Darüber hinaus entdeckten Bratton et al. das *cardiac myosin binding protein-c* (*cMPB-c*) als potentiellen Regulator des MR²⁸⁶.

Die meisten zum MR durchgeführten Interaktions-Studien erfolgten auf Basis des Yeast-Two-Hybrid-Systems. Bei diesen Untersuchungen wurden für den MR im Vergleich zu anderen Steroidrezeptoren nur wenige interagierende Proteine identifiziert, die sich zudem bei den einzelnen Studien voneinander unterschieden^{85,285}. Ein großes Problem des Yeast-Two-Hybrid-Verfahrens liegt jedoch darin, dass diese Methode unter den zahlreichen positiven Klonen einen sehr hohen prozentualen Anteil falsch-positiver Klone mit sich bringt und nur direkte Interaktionen nachweisbar sind. Besser und aussagekräftiger ist daher die Ermittlung möglicher Interaktionspartner auf der Proteinebene. Allerdings ist der MR in dieser Hinsicht nicht einfach zu handhaben, da -wie bereits erwähnt- bislang noch keine ausreichend guten Antikörper für eine Immunpräzipitation existieren. Gekle et al.²⁸⁷ haben auf diesen Umstand in einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit nochmals hingewiesen.

Eine mögliche Ursache für die geringen Expressionsraten des MR könnte ein proteasomaler Abbau sein. Für den GR wurde ein solcher Abbaumechanismus bereits beschrieben. Auch der MR verfügt über sog. PEST-Motive³⁷, die zur Ubiquitinierung und schließlich zum Abbau auf proteasomalem Weg führen könnten. In einer aktuellen Publikation von Yokota et al.³⁶ konnte der Abbau des MR auch über den Proteasom-Inhibitor MG132 (Benzyloxycarbonyl-leucyl-leucyl-leucinal) gehemmt werden. Bei einer 24-stündigen Inkubation mit dem universellen Proteasom-Inhibitor Epoxomicin oder mit MG132 kam es in den hier durchgeführten Untersuchungen in MR-überexprimierenden HEK293T-Zellen selbst in hohen, bereits für die Zellen toxischen Konzentrationen, nicht zu einer Zunahme der Proteinmenge des Rezeptors. Ebenfalls konnte in dem Reporteragen-Assay keine Zunahme der Reporteragenaktivität nach Behandlung der Zellen mit Epoxomicin festgestellt werden. Diese Ergebnisse sprechen daher –zumindest im Modell der HEK293T-Zellen- gegen eine Beteiligung des Proteasoms am MR-Abbau.

Um Interaktionspartner des MR zu identifizieren, wurde eine Präzipitation mit verschiedenen Affinitätstag-Systemen durchgeführt. Es wurden mehrere Konstrukte hergestellt, die an ihrem N-und/oder C-Terminus den Affinitätstag besitzen. Auf diese Weise konnte das Fehlen von ausreichend guten Antikörpern für eine IP umgangen werden. In Aktivierungsstudien mit einem MMTV-Reporteragen-Konstrukt konnte gezeigt werden, dass alle klonierten Konstrukte funktionell aktiv waren. Allerdings konnten nur bei einer Präzipitation des mit dem Strep-Tag fusionierten Konstrukts zufrieden stellende Ausbeuten erreicht werden. Zudem wurde bei Verwendung dieses Systems nur sehr wenig Protein unspezifisch an die Affinitätsmatrix gebunden (vgl. Abbildung 57).

Demzufolge wurden alle weiteren Versuche mit Hilfe des Strep-Tag-Systems durchgeführt.

Die relativ niedrige zelluläre Expression von MR-Koaktivatoren erzwingt die Verwendung von mindestens 10^9 Zellen für Protein-Aufreinigungsverfahren und somit die Durchführung aller Versuche im Großmaßstab. Dies limitierte die Auswahl an Zelllinien deutlich, da nur solche in Frage kamen, die leicht handhabbar sind und einigermaßen einfach in großen Ansätzen kultiviert werden können. Wir haben deshalb HEK293T-Zellen verwendet, die sich durch ein schnelles Wachstum auszeichnen und zudem gut transfizierbar sind. Mit der eingesetzten Calciumphosphat-Methode konnten Transfektions-Effizienzen zwischen 50 und 80% erreicht werden. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass pro Ansatz 20 große Zellkulturschalen ($\varnothing 15$ cm) mit transfizierten, MR-Konstrukt überexprimierenden Zellen benötigt werden.

Im Anschluss an die Inkubation der MR-überexprimierenden Zellen mit MR-Liganden erfolgte die Zell-Lyse und Immunpräzipitation. Daraufhin wurden interagierende Proteine über eindimensionale Gele aufgetrennt, mit Trypsin verdaut und durch Peptidmassen-Fingerprint (MALDI-MS) identifiziert.

Im nicht-aktivierten Zustand liegt der MR bekanntermaßen im Zytosol, an Hitzeschockproteine gebunden, vor. In der Abwesenheit von Steroid konnten dementsprechend einige interagierende Hitzeschockproteine festgestellt werden. Neben HSP90 konnten zwei HSP70-Proteine sowie ein Mitglied der GroEL-Familie als Interaktionspartner identifiziert werden. Eine Interaktion zwischen Mineralocorticoid-Rezeptor und HSP90 ist inzwischen gut dokumentiert^{98-101,103}. Auch auf eine Interaktion mit HSP70 wurde in der Literatur mehrfach hingewiesen^{106,107}. Durch die Bindung an HSP90 wird der Rezeptor in seiner Hormon-bindenden, transkriptionell inaktiven Form stabilisiert¹⁰³. Verschiedene Autoren, unter anderem Yang und DeFranco²⁸⁸, zeigten, dass Molybdat an HSP90 bindet und so zu einer Stabilisierung des Rezeptor-HSP90 Komplexes beitragen kann. Daher wurde nach der Stimulation der Zellen allen Puffern (Lysis-, Wasch-, Elutionspuffer) Molybdat zugesetzt, um zu verhindern, dass die MR-Protein-Komplexe beim Aufbrechen der Zellen und Aufreinigung der Proteine zerfallen.

In Gegenwart des Agonisten Aldosteron waren HSPs zu verschiedenen Zeitpunkten erwartungsgemäß in geringerer Zahl an den MR gebunden als im unstimulierten Zustand. Die HSP90-Bande war im Coomassie-gefärbten SDS-Acrylamid-Gel deutlich stärker ausgeprägt als die des MR, was mit den Beobachtungen von Bresnick et al.²⁸⁹ in gutem Einklang steht, die ein Verhältnis von HSP90 zum GR je nach Versuchsbedingungen von 2:1 bis 4:1 festgestellt haben. Auch in Untersuchungen zum PR wurde ein Verhältnis von HSP90 zum Rezeptor von 2:1 detektiert²⁹⁰. Die Bande für HSP70 war hingegen im SDS-Gel offensichtlich schwächer als die des MR. Das Verhältnis von HSP70 zum GR

bestimmten Diehl und Schmidt dementsprechend auf etwa 1:5²⁹¹, Murphy und Kollegen allerdings auf 1:1, teilweise sogar auf 2:1²⁹².

Aus Untersuchungen zum GR ist bekannt, dass zur Bildung des Rezeptor-HSP90-Komplexes mindestens die drei weiteren Chaperone HSP70, p60 und p23 benötigt werden. In unseren Studien zu Interaktionspartnern des MR wurde ebenfalls das Progesteron-verwandte Protein p23 nachgewiesen. p23 kann neben seiner Funktion als Ko-Chaperon von HSP90 auch als eigenständiges molekulares Chaperon agieren¹¹⁷. Obwohl die Interaktion zwischen p23 und GR oft beschrieben wurde, lag bislang nur ein Nachweis von Freeman und Kollegen¹¹⁵ für eine Interaktion mit dem MR vor.

Als weiteres Chaperon wurde TRiC5 isoliert. Dieses Chaperon ist bisher noch nicht in der Literatur als Interaktionspartner von Steroidrezeptoren erwähnt worden. TRiC ist für die Faltung von Aktin und Tubulin zuständig, die ebenfalls in den hier vorgestellten Untersuchungen als Proteine im MR-Komplex identifiziert werden konnten. Infolge der Stimulation mit Aldosteron löst sich der aktivierte MR von den Chaperonen ab und transloziert daraufhin in den Zellkern. Daher könnten Proteine des Zytoskeletts wie Tubulin und Aktin sowie das Chaperon TRiC, das mit diesen interagiert, für den Transport des MR vom Zytoplasma in den Zellkern verantwortlich sein.

Steroidrezeptoren wirken bekanntermaßen als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren und müssen daher durchs Zytoplasma und durch Kernporen hindurch schließlich an ihren Wirkungsort im Zellkern gelangen. Darüber wie der Transport vom Zytosol in den Zellkern im Detail abläuft, herrscht noch sehr viel Unklarheit. Als Signale, die wahrscheinlich für den nukleären Import von Steroid-Rezeptoren verantwortlich sind, wurden so genannte NLS (nukleäre Lokalisierungs-Signal)-Sequenzen ausgemacht. Der Transport des GR in den Zellkern nach Stimulation durch Liganden wird durch zwei NLS-Sequenzen bestimmt^{293,294}: die NL1 in der DBD und die NL2 in der LBD. Walther et al.²⁹⁴ fanden auch für den MR nukleäre Translokationssignale, die wahrscheinlich an der Regulation des nukleären Imports beteiligt sind: NL0 ist Liganden-unabhängig, NL1 Agonist-spezifisch und NL2 spricht auf Agonisten und Antagonisten an.

Am Beispiel des GR fanden Galigniana und Kollegen²⁹⁵ Hinweise darauf, dass es möglicherweise zwei Mechanismen für die Translokation in den Zellkern gibt und dass sowohl Chaperone als auch das Zytoskelett in diesen Vorgang involviert sind. Während die Translokation unter normalen physiologischen Bedingungen mit einem intakten Netzwerk des Zytoskeletts HSP90-abhängig war, lief sie bei einem zerstörten Zytoskelett unabhängig vom Hitzeschockprotein ab. Der GR gelangte unter diesen Bedingungen wahrscheinlich durch Diffusion in den Zellkern. Die Hypothese eines Zusammenspiels von HSPs und Zytoskelett-Proteinen beim Vorgang der Translokation wird dadurch unterstützt, dass HSP70 und HSP90 mehrfach als Interaktionspartner von Aktin¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ bzw. Mikrofilamenten und Mikrotubuli¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ gefunden wurden. Für den MR liegt noch kein

solcher Nachweis für den Ablauf des Transports in den Zellkern vor. Es ist allerdings zu vermuten, dass für die Translokation analog zum GR ebenfalls Chaperone sowie Proteine des Zytoskeletts zuständig sind. Wenn Chaperone am Transport in den Zellkern beteiligt sind, erklärt dies auch die Beobachtung, dass in den hier durchgeführten Versuchen selbst nach Stimulation mit Aldosteron noch Hitzeschockproteine im Komplex mit dem MR isoliert werden konnten. Daher lässt sich postulieren, dass es sich bei den isolierten Chaperonen sowie den Proteinen des Zytoskeletts Tubulin und Aktin um spezifische Interaktionen mit dem Mineralocorticoid-Rezeptor-Komplex handelt.

Obwohl einige Hinweise dafür sprechen, dass sich der GR^{296,297} und andere Steroidrezeptoren²⁹⁸⁻³⁰² kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytoplasma bewegen, sowohl in ihrer aktiven als auch in ihrer naiven Form²⁹⁴, wurden bislang keine nukleären Exportsignale gefunden. So gelangte in Studien von Haché et al.²⁹⁶ auch der HSP-komplexierte, nicht an Ligand gebundene GR in den Zellkern und recycelte umgekehrt nach dem Einstellen einer Behandlung mit Cortisol in HSP-assoziierte, Hormon-bindende Komplexe. Am Beispiel des Progesteron-Rezeptors (PR) hat zum Beispiel Smith²⁹⁸ demonstriert, dass sich der Rezeptor-HSP90-Komplex in einem dynamischen Zustand befindet, in dem Rezeptor und Hitzeschockprotein unter physiologischen Bedingungen in der Zelle konstant dissoziieren und wieder reassoziieren. Im Gegensatz zu diesem beobachteten bidirektionalen Transport einiger Steroidrezeptoren haben Walther und Kollegen²⁹⁴ hingegen einen unidirektionalen Transport des MR vom Zytosol in den Zellkern festgestellt. Innerhalb von 24 Stunden nach Steroidentzug fand kein Export des MR vom Nukleus ins Zytoplasma statt.

Wir konnten zudem das ubiquitär exprimierte Protein 14-3-3 als Bestandteil des MR-Komplexes identifizieren. Proteine aus der 14-3-3 Familie sind hoch konserviert und kommen in den meisten eukaryotischen Zellen vor. Es sind inzwischen Interaktionen von 14-3-3 mit über 300, im allgemeinen phosphorylierten, Proteinen entdeckt worden. Dementsprechend sind 14-3-3 Proteine in viele verschiedene zelluläre Prozesse involviert. 14-3-3 wurde ebenfalls mehrfach als GR-bindendes Protein ermittelt. Eine Interaktion fand sowohl mit dem Liganden-gebundenen/aktivierten GR als auch mit dem nicht-Liganden-gebundenen/nicht-aktivierten GR statt⁹⁴. Daher spekulieren Wikström⁹⁴ und Widén⁹⁵, dass der GR in Form verschiedener Multiproteinkomplexe mit unterschiedlichen Funktionen existiert, die sie als so genannte „Rezeptosomen“ bezeichnen. Rezeptosomen könnten die Basis für einen Cross-talk zwischen dem GR und anderen Signalwegen darstellen und die Gegenwart von Protein 14-3-3 könnte innerhalb dieser Komplexe GR-Interaktionen mit anderen Proteinen fördern. Ein derartiger Multiproteinkomplex ist auch für den MR sehr wahrscheinlich.

Eine neue physiologische Rolle von 14-3-3 Proteinen in der Kontrolle des epithelialen Ionentransports zeigten erstmals Bhalla und Kollegen⁴³ im Jahr 2005, die inzwischen durch mehrere Veröffentlichungen bestätigt werden konnte³⁰³⁻³⁰⁶. Eine Aktivierung des MR durch Aldosteron führt zur Aktivierung von Sgk1 und ENaC. Die Interaktion zwischen Sgk1 und ENaC erfolgt über die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2: die Sgk1-abhängige Phosphorylierung und dadurch Inaktivierung von Nedd4-2 resultiert in einer Aktivierung des ENaC und damit einer Erhöhung des Natriumeinstroms (s. auch Kap. 1.4.2).

Bhalla⁴³, Nagaki³⁰³, Ichimura³⁰⁴ und Kollegen demonstrierten, dass für die Sgk1-vermittelte Hemmung von Nedd4-2 eine Interaktion mit 14-3-3 notwendig ist. Liang et al.³⁰⁵ fanden eine durch Aldosteron erhöhte Expression von 14-3-3 β , welches mit dem phosphorylierten Nedd4-2 interagiert und dessen Interaktion mit ENaC blockiert. Diese Daten unterstützen deshalb die hier gefundene Interaktion von 14-3-3

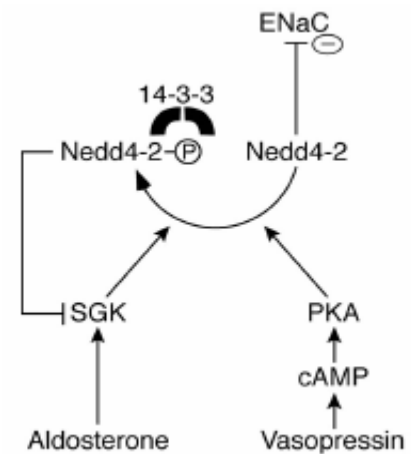


Abbildung 64 Regulation des ENaC Trafficking via Nedd 4-2³⁰⁷

Proteinen mit dem MR und deuten auf eine physiologische Bedeutung dieser Interaktion hin. Die Regulation der Proteinexpression in der Zelle unterliegt der koordinierten Kontrolle von Transkription, mRNA Translation und Degradation. Die Mechanismen von Transkription und Proteinabbau wurden in der Niere detailliert untersucht, die der Translation haben jedoch nicht so viel Aufmerksamkeit erhalten³⁰⁸. Die Translation läuft in 3 Stufen ab: Initiation, Elongation und Termination. Den entscheidenden, weil geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Proteinbiosynthese stellt die Elongation dar. Hieran sind bei Eukaryoten zwei Faktoren beteiligt: der Elongationsfaktor 1, der für die Rekrutierung von aatRNA an die A-Stelle am Ribosom zuständig ist, und der Elongationsfaktor 2, der die Translokation der neuen Peptidyl-tRNA von der A- in die P-Stelle am Ribosom vermittelt. Für den Glucocorticoid-Rezeptor konnten mehrfach andere Transkriptionsfaktoren als Interaktionspartner nachgewiesen werden³⁰⁹⁻³¹¹, über eine Interaktion mit Faktoren der Translation wurde bisher noch nicht berichtet. In der Literatur wurde bislang nur der Transkriptions-Elongationsfaktor ELL (eleven-nineteen lysine rich leukemia) als MR-interagierendes Protein beschrieben. Diese Studie von Pascual-Le Tallec et al.³¹² ist der erste direkte Nachweis einer funktionellen Interaktion zwischen einem nukleären Rezeptor und einem Elongationsfaktor. Von ELL ist hauptsächlich bekannt, dass er als RNA Polymerase II Elongationsfaktor agiert, der, wenn er an MLL (mixed lineage leukemia) gebunden ist, zur Pathogenese der akuten Leukämie beiträgt. Pascual-Le Tallec und Kollegen zeigten eine weitere Funktion von ELL als Koaktivator für

den MR und als Korepressor für den GR. In den hier durchgeführten Interaktionsstudien konnten sowohl der Elongationsfaktor eEF-1 γ als auch eEF-2 als Proteine im MR-Komplex identifiziert werden. Dies könnte auf eine neue Rolle des MR auch bei der Regulation der Translation hindeuten.

Unter den im MR-Komplex identifizierten Proteinen befand sich auch eine große Anzahl von metabolischen Enzymen. Da diese sowohl mit dem N- als auch dem C-terminalen MR-Fusionskonstrukt komplexiert wurden, kann man annehmen, dass es sich hierbei um spezifische Interaktionen handelt. Zu den gefundenen Enzymen gehören vor allem Proteine, die in Glucose-Produktion und -Abbau involviert sind.

Glucocorticoide und der GR nehmen Einfluss auf zahlreiche metabolische Signalwege, wie z.B. den Glukose-Metabolismus. Für den MR war eine solche Bedeutung für metabolische Mechanismen bisher allerdings umstritten. Erste Hinweise darauf, dass auch der MR in Prozesse der Glukoneogenese eingebunden sein könnte, lieferten Untersuchungen von Liu und Kollegen¹⁸¹, in denen der MR sowohl die Expression von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Glucose-6-phosphatase als auch die von Fructose-1,6-bisphosphatase 1 regulierte. Die hier durchgeführte Identifizierung glykolytischer und glukoneogenetischer Proteine als Komponenten im MR-Komplex erscheint deshalb plausibel und könnte auf eine bisher unbekannte physiologische Bedeutung des MR hindeuten.

Nach Stimulation mit den Liganden Aldosteron und Spironolacton konnten zudem im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zwei Proteine ermittelt werden, die offensichtlich abhängig vom jeweiligen Liganden mit dem Mineralocorticoid-Rezeptor interagierten. Während GRP78 und das β -Propionyl-CoA-carboxylase Vorläuferprotein sowohl bei unstimulierten als auch in mit Aldosteron stimulierten Zellen gefunden wurden, konnten sie nach einer Inkubation mit Spironolacton nicht mehr identifiziert werden.

GRP78 ist das einzige im ER lokalisierte Mitglied der HSP70-Familie und ist hauptsächlich für die Faltung neu synthetisierter Proteine im ER-Lumen zuständig und wurde bereits von Hutchison et al. als GR-bindendes Protein isoliert. GRP78 übernimmt durch seine Bindung an den GR im Gegensatz zum zytoplasmatischen HSP70 keine Funktion in der Bildung des GR-Heterokomplexes^{269,103}.

Die mitochondriale Propionyl-CoA-carboxylase spielt eine Rolle in der Fettsäureoxidation. Eine Interaktion mit Steroidrezeptoren ist bislang noch nicht beschrieben worden.

Das β -Propionyl-CoA-carboxylase Vorläuferprotein konnte sowohl mit dem C- als auch dem N-terminal fusionierten MR-Konstrukt massenspektrometrisch identifiziert werden, was auf eine spezifische Interaktion hindeutet. Es ist jedoch vorstellbar, dass durch die gewählten Lysebedingungen bei der Isolierung des MR-Proteinkomplexes eine Vermischung von Kompartimenten stattgefunden hat. Hierdurch könnte der MR mit Proteinen in Kontakt gekommen sein, mit denen er unter physiologischen Bedingungen

nicht assoziieren würde. Deshalb muss in weiteren Versuchen nachgewiesen werden, ob es sich bei diesen mitochondrialen bzw. ER-Proteinen tatsächlich um physiologisch relevante Interaktionspartner des MR-Komplexes handelt. Die Abhängigkeit der Interaktion von unterschiedlichen Konformationen des Rezeptors, die durch Aldosteron bzw. Spironolacton induziert werden, spricht allerdings sehr dafür.

Hultman et al.⁸² haben ebenfalls intensiv nach Interaktionen zwischen MR und Koaktivator bzw. Korepressor Peptiden gesucht und festgestellt, dass die MR LBD in der Gegenwart von Aldosteron im Vergleich zu anderen nukleären Rezeptoren nur mit wenigen Koaktivator-Peptiden interagiert. Diese Peptide, mit denen die MR LBD interagiert, stammen aus der p160 Familie (SRC1, RIP140, ASC2, PGC1 α und β). In den hier durchgeführten affinitätschromatographischen Untersuchungen konnte keines der eben genannten Proteine als MR-bindendes Protein isoliert werden. Es konnten ebenfalls einige andere in der Literatur beschriebene interagierende Proteine des MR in diesen Versuchen nicht identifiziert werden. Hierbei handelt sich unter anderem um Transkriptionsfaktoren (z.B. hTIF1³¹³, STAT1³¹⁴).

Die Beobachtung, dass keine Transkriptionsfaktoren in den MR-Komplexen identifiziert werden konnten, entsprach nicht den Erwartungen. Es ist bekannt, dass sich der MR nach der Aktivierung durch seinen Liganden Aldosteron von den HSPs ablöst und in den Zellkern transloziert, wo er als Transkriptionsfaktor wirkt. Selbst nach einer zweistündigen Stimulation mit Aldosteron wurden in unseren Versuchen aus der Transkriptions-/Translationsmaschinerie jedoch nur die Elongationsfaktoren eEF1 γ und eEF2 im MR-Komplex gefunden.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der MR so fest an den Zellkern bindet, dass er unter den gewählten Lysebedingungen nicht ausreichend von der DNA abgelöst werden konnte. Die präzipitierten MR-Proteinkomplexe lagen wahrscheinlich alle zytosolisch vor oder befanden sich im Transferzustand vom Zytosol in den Zellkern, da die Zellkerne bereits beim ersten Zentrifugationsschritt bei 1000g abgetrennt werden. Ein Vorversuch hat gezeigt, dass durch Erhöhung der Salzkonzentration aus diesem ersten Pellet ein erheblicher Anteil MR extrahiert werden konnte. Unter diesen harscheren Bedingungen kann zwar der aktivierte Rezeptor von der DNA gelöst werden, jedoch zerfällt auch der MR-Protein-Komplex. Daher sind alternative Vorgehensweisen für weitere Untersuchungen notwendig.

Eine alternative Erklärung liegt im hohen Molekulargewicht der Transkriptionsfaktoren begründet. Bei der Auftrennung der isolierten Proteine im eindimensionalen SDS-Gel sind diese dadurch möglicherweise aufgrund ihres hohen Molekulargewichts nicht ins Trenngel gewandert, sondern sind im Sammelgel verblieben, wodurch sie einer Analyse nicht zugänglich waren. Für weitere Untersuchungen sollten deshalb alternative Trennverfahren in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in der Literatur beschriebenen, gut dokumentierten Interaktionen des Mineralocorticoid-Rezeptors mit Hitzeschockproteinen (HSP70, HSP90) sowie mit Proteinen des Zytoskeletts (Aktin, Tubulin) reproduziert werden konnten.

Daneben konnten auch einige Interaktionspartner, die für verschiedene Steroidrezeptoren erwähnt wurden, bisher aber noch nicht für den MR nachgewiesen werden konnten, identifiziert werden. Hierzu gehören p23, das Protein 14-3-3, die Elongationsfaktoren eEF1 γ und eEF2 und das Chaperon GRP78.

Zusätzlich wurden neue Proteine im MR-Komplex isoliert. Neben glykolytischen Enzymen wie α -Enolase, Aldolase, LDH und GAPDH wurden das β -Propionyl-CoA-carboxylase Vorläufermolekül, Transgelin 2, PCMT und Kreatinkinase massenspektrometrisch identifiziert. Die biologische Bedeutung dieser Proteine als Interaktionspartner des MR ist noch unklar.

Zwei der isolierten Proteine assoziierten Liganden-abhängig mit dem Mineralocorticoid-Rezeptor. Diese wurden sowohl ohne Steroid als auch nach Stimulation mit Aldosteron als Bestandteile des MR-Komplexes isoliert; in Anwesenheit von Spironolacton fand jedoch die Bindung dieser beiden Proteine an den Komplex nicht statt. Hierbei handelt es sich um das Hitzeschockprotein GRP78, das üblicherweise im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und um die nicht biotinylierte Untereinheit der Propionyl-CoA-carboxylase. Die physiologische Bedeutung dieser Konformations-abhängigen Interaktion der beiden Proteine mit dem MR-Komplex ist ebenfalls unklar.

In weiterführenden Versuchen bleibt abzuklären, ob die physikalische Interaktion zwischen dem MR und den Bestandteilen des MR-Komplexes tatsächlich eine physiologische Bedeutung hat. Hierfür sollen zum einen mit dem MR-Expressionsplasmid stabil transfizierte HEK293T-Zellen hergestellt werden. Dies erleichtert Versuchsansätze im Großmaßstab erheblich, da zur Isolierung ausreichender Mengen an Protein mindestens 10^9 Zellen benötigt werden und eine transiente Transfektion für diesen Zweck sehr aufwendig ist. Zudem sollten diese Versuche in „physiologischen“ Zelllinien, z.B. M1-Zellen, wiederholt werden.

Als weitere interessante Frage wird zu überprüfen sein, ob die identifizierten putativen MR-Interaktionspartner eine Koregulatorfunktion ausüben. Dies könnte durch Kotransfektion des MR-Expressionsplasmids und des MR-Interaktionspartners in Transaktivierungs-Assays überprüft werden.

Um mehr Informationen über die Interaktion des jeweiligen Proteins mit dem MR zu erhalten, sollten zudem MR-Deletionskonstrukte hergestellt werden. Dies ermöglicht die Identifizierung essentieller Domänen des MR, die für die Wechselwirkung verantwortlich sind. Zunächst sollten verkürzte Konstrukte angefertigt werden, bei denen entweder vom C-Terminus (für N-terminale Konstrukte) oder vom N-Terminus (für C-terminale Konstrukte) verschiedene Domänen deletiert sind. Nach einer Charakterisierung via Transaktivierungsassays sollten die verkürzten Konstrukte entsprechend den bisher durchgeführten Experimenten transfiziert und die Zellen aufgearbeitet werden. Anschließend wird das Muster interagierender Proteine verglichen.

5 Anhang

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Natriumresorptionsmechanismen in den einzelnen Tubulusabschnitten.....	2
Abbildung 2	Mechanismus von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	4
Abbildung 3	Intrazelluläre Signaltransduktion durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP).....	5
Abbildung 4	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	6
Abbildung 5	Mechanismus des Ionentransports im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron	7
Abbildung 6	Aufbau des Mineralocorticoid Rezeptors	8
Abbildung 7	Schematische Darstellung der Strukturen von MR und GR mit prozentuaalem Anteil der Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz in den einzelnen Domänen	9
Abbildung 8	Phylognese der Steroidhormon-Rezeptoren.....	9
Abbildung 9	Liganden des Mineralocorticoid-Rezeptors	10
Abbildung 10	Angriff von Aldosteron und Cortisol am Mineralocorticoid-Rezeptor.	11
Abbildung 11	Der Ubiquitin-Proteasom-Weg.....	12
Abbildung 12	Prozessierung und Abbau des MR.....	13
Abbildung 13	Aufbau ENaC	14
Abbildung 14	Regulation der ENaC Expression.....	15
Abbildung 15	Mögliche Aldosteron-induzierte Regulationsmechanismen im distalen Tubulus.....	18
Abbildung 16	Prinzip der multiple site Mutagenese.....	36
Abbildung 17	Schematische Darstellung der Zero-Blunt-TOPO-Klonierung von Blunt-end-DNA.	40
Abbildung 18	Detektion von Proteinen auf Blotmembranen	46
Abbildung 19	Centricon-Konzentrator	47
Abbildung 20	Prinzip und Funktion des One-Strep [®] -Kit	49
Abbildung 21	Recycling der Strep-Tactin [®] -Säulen (www.iba-go.com).....	50
Abbildung 22	Bestimmung des transepithelialen Widerstands mit dem EVOM	52
Abbildung 23	Messung des Kurzschlussstroms I _{sc} in der Ussing-Kammer mit der open-circuit und der voltage-clamp Methode.....	53
Abbildung 24	Chemilumineszenz-Reaktion beim Luciferase-Assay	56
Abbildung 25	Funktionsweise des MALDI.....	59
Abbildung 26	Induktion von Sgk1 durch Aldosteron und Dexamethason in primären DTEC-Zellen, bestimmt über Real-time PCR.	

Abbildung 27	Überprüfung der Expression von (a) RGS3 (b) GDI2 (c) GRK5 (d) ARL7 nach Stimulation mit Aldosteron und Dexamethason in DTEC-Zellen.	63
Abbildung 28	pcDNA3.1/Zeo Expressionsvektor.....	64
Abbildung 29	Nachweis der Expression von GDI2, GRK5, RGS3 und ARL7 in stabil transfizierten M1-Zellen durch PCR.	66
Abbildung 30	Überprüfung von Zellproliferation und Proteinsyntheserate in stabil transfizierten M1-Zellen am Beispiel der überexprimierten Gene GDI2 und ARL7.....	67
Abbildung 31	Modulation der cAMP-Synthese durch Aldosteron nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli	69
Abbildung 32	Schematische Darstellung des epithelialen Transports im Sammelrohr	72
Abbildung 33	Apikal Amilorid erzeugte eine sehr schnelle Reduktion von Isc.....	72
Abbildung 34	Permeabilisierung der apikalen Membran durch Amphotericin B in steigender Konzentration und anschließende Hemmung der basolateralen Na ⁺ /K ⁺ -ATPase durch 5mM Ouabain.	73
Abbildung 35	Basolaterales Noradrenalin (10µM) erzeugte einen transienten Anstieg in Isc	73
Abbildung 36	Modell der Bindung von Aldosteron und Cortisol am MR.....	79
Abbildung 37	Prinzip des Biotin-Tag-Systems	82
Abbildung 38	Klonierungsstrategie für den Biotin-Tag-Mineralocorticoid-Rezeptor	83
Abbildung 39	Überexpression von pcDNA3.1/Zeo-Biotin-Tag-rMR und pcDNA3.1-BirA in HEK293T Zellen.....	84
Abbildung 40	Transkriptionelle Aktivierung von Biotin-Tag MR.....	85
Abbildung 41	Überexpression von EGFP-hMR in HEK293T-Zellen	86
Abbildung 42	Immunpräzipitation von EGFP-hMR mit anti-GFP-Antikörper.....	87
Abbildung 43	Transaktivierung von EGFP-MR nach Stimulation mit Aldosteron.....	88
Abbildung 44	Expression FLAG-tag-Mineralocorticoid-Rezeptor.....	89
Abbildung 45	Transkriptionelle Aktivierung von Flag-Tag MR.....	90
Abbildung 46	Expressionsvektoren pEXPR-IBA 103 (Tag C-terminal) bzw. pEXPR-IBA 105 (Tag N-terminal)	91
Abbildung 47	Klonierung von hMR in den pEXPR-IBA Expressionsvektor.....	92
Abbildung 48	Bsal-Schnittstellen in der Aminosäuresequenz des humanen Mineralocorticoid-Rezeptors.....	93
Abbildung 49	Überexpression des Strep-getaggten MR in HEK293T Zellen versus nicht-transfizierte HEK293T-Zellen.....	94
Abbildung 50	Expression des humanen Mineralocorticoid-Rezeptors nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden in HEK293T Zellen.	95
Abbildung 51	Transkriptionelle Aktivierung von Strep-Tag MR.	96

Abbildung 52	Transaktivierung des MR nach Stimulation mit Aldosteron.....	96
Abbildung 53	Isolierung von N- und C-terminal Strep-Tag fusionierten hMR und interagierender Proteine nach Stimulation mit 10nM Aldosteron (5 Minuten).....	98
Abbildung 54	Isolierung des N-terminal Strep-Tag fusionierten hMR und interagierender Proteine nach Stimulation mit 10nM Aldosteron für 5 Minuten oder 2 Stunden.....	99
Abbildung 55	Schematische Darstellung von Glykolyse und Glukoneogenese und den daran beteiligten Enzymen.....	105
Abbildung 56	Kreislauf zwischen NAD^+ und NADH,H^+ in der Glykolyse.....	107
Abbildung 57	Isolierung des C- und N-terminal mit dem Strep-Tag fusionierten MR und potentieller interagierender Proteine nach Stimulation mit Aldosteron oder Spironolacton.....	115
Abbildung 58	Funktion von Propionyl-CoA-Carboxylase.....	117
Abbildung 59	Transaktivierung des N- und C-terminal Strep-Tag fusionierten MR durch Cortisol.....	120
Abbildung 60	Auftrennung des isolierten N-terminal mit dem Strep-Tag fusionierten MR und potentieller interagierender Proteine nach Stimulation mit Carbenoxolon, Cortisol, Carbenoxolon plus Cortisol oder Ethanol in einer 1D-Gelelektrophorese.....	121
Abbildung 61	Einfluss des Redoxstatus in der Zelle auf die Transaktivierung des MR durch Cortisol und Aldosteron.....	122
Abbildung 62	Proteasomale Hemmung des MR Abbaus.....	124
Abbildung 63	Proteasomale Hemmung des MR, Transaktivierungsassay.....	125
Abbildung 64	Regulation des ENaC Trafficking via Nedd 4-2.....	131

5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Primärantikörper	22
Tabelle 2	Sekundärantikörper.....	22
Tabelle 3	Verwendete Lösungen und Puffer	25
Tabelle 4	Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.....	28
Tabelle 5	PCR-Programm für eine konventionelle PCR.....	34
Tabelle 6	Light Cycler RT-PCR-Programm	35
Tabelle 7	PCR-Reaktion Multiple site Mutagenesis	37
Tabelle 8	Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen	45
Tabelle 9	Im cAMP-Assay verwendete Stimulantien. AC Adenylylcyclase	54
Tabelle 10	Ermittelte Real-time PCR Bedingungen	61
Tabelle 11	Übersicht über MR-interagierende Proteine, identifiziert durch MALDI Massenspektrometrie.....	100

5.3 Literaturverzeichnis

- ¹ Knepper MA, Wade JB, Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Mandon B, Chou CL, Kishore BK, Nielsen S. (1996) Renal aquaporins. *Kidney Int.* **49(6):1712-7**
- ² Sabolic I, Katsura T, Verbavatz JM, Brown D. (1995) The AQP2 water channel: effect of vasopressin treatment, microtubule disruption, and distribution in neonatal rats. *J Membr Biol.* **143(3):165-75**
- ³ Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem.* **63:101-32**
- ⁴ Berman DM, Gilman AG (1998) Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J Biol Chem.* **273(3):1269-72.**
- ⁵ Wieland T, Chen CK (1999) Regulators of G-protein signalling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **360(1):14-26**
- ⁶ Premont (2005) Once and future signaling: G protein-coupled receptor kinase control of neuronal sensitivity. *Neuromolecular Med.* **7(1-2):129-47.**
- ⁷ Kemendy AE, Kleyman TR, Eaton DC. (1992) Aldosterone alters the open probability of amiloride-blockable sodium channels in A6 epithelia. *Am J Physiol.* **263(4 Pt 1):C825-37**
- ⁸ Helman SI, Liu X, Baldwin K, Blazer-Yost BL, Els WJ. (1998) Time-dependent stimulation by aldosterone of blocker-sensitive ENaCs in A6 epithelia. *Am J Physiol.* **274(4 Pt 1):C947-57**
- ⁹ Baxendale-Cox LM, Duncan RL, Liu X, Baldwin K, Els WJ, Helman SI (1997) Steroid hormone-dependent expression of blocker-sensitive ENaCs in apical membranes of A6 epithelia. *Am J Physiol.* **273(5 Pt 1):C1650-6**
- ¹⁰ Pacha J, Frindt G, Antonian L, Silver RB, Palmer LG (1993) Regulation of Na channels of the rat cortical collecting tubule by aldosterone. *J Gen Physiol.* **102(1):25-42**
- ¹¹ Booth RE, Johnson JP, Stockand JD Aldosterone (2002) *Adv Physiol Educ.* **26(1-4):8-20**

- ¹² Asher C, Wald H, Rossier BC, Garty H. (1996) Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺ channel subunits *Am J Physiol.* **271**(2 Pt 1):C605-11
- ¹³ Verrey F, Schaerer E, Zoerkler P, Paccolat MP, Geering K, Kraehenbuhl JP, Rossier BC. (1987) Regulation by aldosterone of Na⁺,K⁺-ATPase mRNAs, protein synthesis, and sodium transport in cultured kidney cells. *J Cell Biol.* **104**(5):1231-7
- ¹⁴ Funder JW. (2005) The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev.* **26**(3):313-21
- ¹⁵ Alzamora R, Michea L, Marusic ET (2000) Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension.* **35**(5):1099-104
- ¹⁶ Alzamora R, Marusic ET, Gonzalez M, Michea L. (2003) Nongenomic effect of aldosterone on Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase in arterial vessels. *Endocrinology.* **144**(4):1266-72
- ¹⁷ Michea L, Delpiano AM, Hitschfeld C, Lobos L, Lavandero S, Marusic ET. (2005) Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology.* **146**(3):973-80
- ¹⁸ Wehling M, Kasmayr J, Theisen K. (1991) Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? *Am J Physiol* **260**: E719-E726
- ¹⁹ Farman N, Rafestin-Oblin ME (2001) Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol.* **280**(2):181-192.
- ²⁰ Fuse H, Kitagawa H, Kato S (2000) Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1). *Mol Endocrinol.* **14**(6):889-99
- ²¹ Lavery DN, McEwan IJ. (2005) Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J.* **391**(3):449-64
- ²² Kitagawa H, Yanagisawa J, Fuse H, Ogawa S, Yogiashi Y, Okuno A, Nagasawa H, Nakajima T, Matsumoto T, Kato S. (2002) Ligand-selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function 1 by a CBP-containing histone acetyltransferase complex. *Mol Cell Biol.* **22**(11):3698-706.

- ²³ Obradovic D, Tirard M, Nemethy Z, Hirsch O, Gronemeyer H, Almeida OF (2004) DAXX, FLASH, and FAF-1 modulate mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated transcription in hippocampal cells--toward a basis for the opposite actions elicited by two nuclear receptors? *Mol Pharmacol.* **65**(3):761-9.
- ²⁴ Bridgham JT, Carroll SM, Thornton JW (2006) Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation. *Science.* **312**(5770):97-101
- ²⁵ Li Y, Suino K, Daugherty J, Xu HE (2005) Structural and biochemical mechanisms for the specificity of hormone binding and coactivator assembly by mineralocorticoid receptor. *Mol Cell.* **19**(3):367-80.
- ²⁶ Rogerson FM, Dimopoulos N, Sluka P, Chu S, Curtis AJ, Fuller PJ (1999) Structural determinants of aldosterone binding selectivity in the mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem.* **274**(51):36305-11
- ²⁷ Mihailidou AS, Funder JW (2005) Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system. *Steroids* **70**(5-7): 347-351
- ²⁸ Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell.* **92**(3):367-80.
- ²⁹ Walz J, Erdmann A, Kania M, Typke D, Koster AJ, Baumeister W. (1998) 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol.* **121**(1):19-29.
- ³⁰ Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays.* **22**(5):442-51
- ³¹ Callige M, Richard-Foy H (2006) Ligand-induced estrogen receptor alpha degradation by the proteasome: new actors? *Nucl Recept Signal.* **4**:e004.
- ³² Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N (1999) Proteasome-Mediated Proteolysis of Estrogen Receptor: A Novel Component in Autologous Down-Regulation. *Molecular Endocrinology* **13**(9): 1522-1534
- ³³ Zhou J, Cidlowski JA (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids.* **70**(5-7):407-17.

- ³⁴ Wallace AS, Cidlowski JA (2001) Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signalling by glucocorticoids. *J Biol Chem* **276**(46): 42714-21
- ³⁵ Pascual-Le Tallec L, Lombes M. (2005) The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol.* **19**(9):2211-21.
- ³⁶ Yokota K, Shibata H, Kobayashi S, Suda N, Murai A, Kurihara I, Saito I, Saruta T (2004) Proteasome-mediated mineralocorticoid receptor degradation attenuates transcriptional response to aldosterone. *Endocr Res.* **30**(4):611-6.
- ³⁷ Pascual-Le Tallec L, Lombes M (2005) The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol.* **19**(9):2211-21.
- ³⁸ Weinberger MH 2004 Eplerenone: a new selective aldosterone receptor antagonist. *Drugs Today (Barc)* **40**(6):481–485
- ³⁹ Pitt B, Zannad F, Remme W, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J, (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. The **R**andomized **A**ldactone **E**valuation **S**tudy. *N Engl J Med* **341**(10): 709-717
- ⁴⁰ Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gattlin M (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. The **E**plerenone **p**ost-acute myocardial infarction **h**eart failure **e**fficacy and **s**urvival **s**tudy (EPHESUS study). *N Engl J Med* **348**(14): 1309-1321
- ⁴¹ Gormley K, Dong Y, Sagnella GA (2003) Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins. *Biochem J.* **371**(1):1-14
- ⁴² Snyder PM. (2002) The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension. *Endocr Rev.* **23**(2):258-75
- ⁴³ Bhalla V, Daidie D, Li H, Pao AC, LaGrange LP, Wang J, Vandewalle A, Stockand JD, Staub O, Pearce D. (2005) Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein 4-2 by inducing interaction with 14-3-3. *Mol Endocrinol.* **19**(12):3073-84.

- ⁴⁴ Kellner M, Peiter A, Hafner M, Feuring M, Christ M, Wehling M, Falkenstein E, Losel R (2003) Early aldosterone up-regulated genes: new pathways for renal disease? *Kidney Int.* **64**(4):1199-207.
- ⁴⁵ Koppel H, Christ M, Yard BA, Bar PC, van der Woude FJ, Wehling M (2003) Nongenomic effects of aldosterone on human renal cells *Clin. Endocrinol Metab.* **88**(3):1297-302
- ⁴⁶ Christ M, Wehling M, Kirsch E, Viengchareun S, Zennaro MC, Lombes M (2005) Enhancement of beta-adrenergic cAMP-signaling by the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol.* **231**(1-2):23-31.
- ⁴⁷ Massaad C, Houard N, Lombes M, Barouki R (1999) Modulation of human mineralocorticoid receptor function by protein kinase A. *Mol Endocrinol.* **13**(1):57-65
- ⁴⁸ Mittmann C, Schuler C, Chung CH, Hoppner G, Nose M, Kehrl JH, Wieland T. (2001) Evidence for a short form of RGS3 preferentially expressed in the human heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **363**(4):456-63
- ⁴⁹ Gruning W, Arnould T, Jochimsen F, Sellin L, Ananth S, Kim E, Walz G (1999) Modulation of renal tubular cell function by RGS3. *Am J Physiol.* **276**(4 Pt 2):535-43.
- ⁵⁰ Shisheva A, Sudhof TC, Czech MP. (1994) Cloning, characterization, and expression of a novel GDP dissociation inhibitor isoform from skeletal muscle. *Mol Cell Biol.* **14**(5):3459-68
- ⁵¹ Ullrich O, Stenmark H, Alexandrov K, Huber LA, Kaibuchi K, Sasaki T, Takai Y, Zerial M. (1993) Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem.* **268**(24):18143-50.
- ⁵² Yang C, Slepnev VI, Goud B. (1994) Rab proteins form in vivo complexes with two isoforms of the GDP-dissociation inhibitor protein (GDI). *J Biol Chem.* **269**(50):31891-9
- ⁵³ Saxena SK, Kaur S (2006) Regulation of epithelial ion channels by Rab GTPases. *Biochem Biophys Res Commun.* **351**(3):582-7.
- ⁵⁴ Saxena S, Singh M, Engisch K, Fukuda M, Kaur S (2005) Rab proteins regulate epithelial sodium channel activity in colonic epithelial HT-29 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **337**(4):1219-23

- ⁵⁵ Mastroberardino L, Spindler B, Forster I, Loffing J, Assandri R, May A, Verrey F (1998) Ras pathway activates epithelial Na⁺ channel and decreases its surface expression in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell*. **9**(12):3417-27
- ⁵⁶ Jacobs S, Schilf C, Fliegert F, Kolling S, Weber Y, Schurmann A, Joost HG. (1999) ADP-ribosylation factor (ARF)-like 4, 6, and 7 represent a subgroup of the ARF family characterization by rapid nucleotide exchange and a nuclear localization signal. *FEBS Lett*. **456**(3):384-8.
- ⁵⁷ Fields S, Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. **340**(6230):245-6
- ⁵⁸ McAlister-Henn L, Gibson N, Panisko E. (1999) Applications of the yeast two-hybrid system. *Methods*. **19**(2):330-7
- ⁵⁹ Deane CM, Salwinski L, Xenarios I, Eisenberg D. (2002) Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations. *Mol Cell Proteomics*. **1**(5):349-56
- ⁶⁰ Gomez-Sanchez CE, de Rodriguez AF, Romero DG, Estess J, Warden MP, Gomez-Sanchez MT, Gomez-Sanchez EP. (2006) Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology*. **147**(3):1343-8.
- ⁶¹ Baer PC, Nockher WA, Haase W, Scherberich JE. (1997) Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note. *Kidney Int*. **52**(5):1321-31
- ⁶² Baer PC, Tunn UW, Nunez G, Scherberich JE, Geiger H. (1999) Transdifferentiation of distal but not proximal tubular epithelial cells from human kidney in culture. *Exp Nephrol*. **7**(4):306-13.
- ⁶³ Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. **36**(1):59-74
- ⁶⁴ Heinzl SS, Krysan PJ, Calos MP, DuBridgde RB. (1988) Use of simian virus 40 replication to amplify Epstein-Barr virus shuttle vectors in human cells. *J Virol*. **62**(10):3738-46
- ⁶⁵ Shuman S. (1992) DNA strand transfer reactions catalyzed by vaccinia topoisomerase I. *J Biol Chem*. **267**(12):8620-7

- ⁶⁶ Shuman S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem.* **269**(51):32678-84
- ⁶⁷ Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* **20**(18):3551-67
- ⁶⁸ Nazareth LV, Weigel NL. (1996) Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem.* **271**(33):19900-7.
- ⁶⁹ Beck CA, Weigel NL, Moyer ML, Nordeen SK, Edwards DP. (1993) The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(10):4441-5.
- ⁷⁰ Azhipa Ial, Egorova LK. (1992) Cyclic AMP in the kidneys of adrenalectomized and nonadrenalectomized normal rats and rats with reflex dystrophy against a background of organ denervation and a total block of the body's beta-adrenoreceptors by propranolol. *Izv Akad Nauk SSSR Biol.* **5**:733-43
- ⁷¹ Nakhoul N, Hering-Smith K, Gambala C, Hamm LL (1998) Regulation of sodium transport in M1 cells. *Am J Physiol* **275**(6 Pt 2):F998-F1007.
- ⁷² Letz B, Korbmacher C (1997) cAMP stimulates CFTR-like Cl⁻ channels and inhibits amiloride-sensitive Na⁺ channels in mouse CCD cells. *Am J Physiol.* **272**(2 Pt 1):C657-66
- ⁷³ Fuller CM, Benos DJ (1992) CFTR! *Am J Physiol.* **263**(2 Pt 1):C267-86.
- ⁷⁴ Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC. (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science.* **269**(5225):847-50
- ⁷⁵ Kunzelmann K. (2003) ENaC is inhibited by an increase in the intracellular Cl⁽⁻⁾ concentration mediated through activation of Cl⁽⁻⁾ channels. *Pflugers Arch.* **445**(4):504-12
- ⁷⁶ Bachhuber T, König J, Voelcker T, Murle B, Schreiber R, Kunzelmann K (2005) Cl⁻ interference with the epithelial Na⁺ channel ENaC. *J Biol Chem.* **280**(36):31587-94

- ⁷⁷ Ji HL, Chalfant ML, Jovov B, Lockhart JP, Parker SB, Fuller CM, Stanton BA, Benos DJ (2000) The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J Biol Chem.* **275**(36):27947-56
- ⁷⁸ Kunzelmann K, Kiser GL, Schreiber R, Riordan JR (1997) Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett.* **400**(3):341-4
- ⁷⁹ Cuffe JE, Howard DP, Bertog M, Korbmacher C (2002) Basolateral adrenoceptor activation mediates noradrenaline-induced Cl⁻ secretion in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *Pflugers Arch.* **445**(3):381-9
- ⁸⁰ Koppel H, Christ M, Yard BA, Bar PC, van der Woude FJ, Wehling M (2003) Nongenomic effects of aldosterone on human renal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**(3):1297-302.
- ⁸¹ Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER, Monder C (1988) Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet.* **2**(8618):986-9
- ⁸² Hultman ML, Krasnoperova NV, Li S, Du S, Xia C, Dietz JD, Lala DS, Welsch DJ, Hu X (2005) The ligand-dependent interaction of mineralocorticoid receptor with coactivator and corepressor peptides suggests multiple activation mechanisms. *Mol Endocrinol* **19**(6): 1460-1473
- ⁸³ Galigniana (1996) Stability study on renal type I mineralocorticoid receptor. *Life Sciences* **59**(7): 511-521
- ⁸⁴ Li Y, Suino K, Daugherty J, Xu HE (2005) Structural and biochemical mechanisms for the specificity of hormone binding and coactivator assembly by mineralocorticoid receptor. *Mol Cell.* **19**(3):367-80.
- ⁸⁵ Albers M, Kranz H, Kober I, Kaiser C, Klink M, Suckow J, Kern R, Koegl M (2005) Automated yeast two-hybrid screening for nuclear receptor-interacting proteins. *Mol Cell Proteomics* **4**: 205-213
- ⁸⁶ Albert S, Gaudan S, Knigge H, Raetsch A, Delgado A, Huhse B, Kirsch H, Albers M, Rebholz-Schuhmann D, Koegl M. (2003) Computer-assisted generation of a protein-interaction database for nuclear receptors. *Mol Endocrinol.* **17**(8):1555-67

- ⁸⁷ de Boer E, Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Katsantoni E, Heck A, Grosveld F, Strouboulis J. (2003) Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**(13):7480-5.
- ⁸⁸ Beckett D, Kovaleva E, Schatz PJ (1999) A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci*. **8**(4):921-9
- ⁸⁹ Voss S, Skerra A (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng*. **10**(8):975-82.
- ⁹⁰ Skerra A, Schmidt TG (1999) Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep tag. *Biomol Eng*. **16**(1-4):79-86
- ⁹¹ Szybalski W, Kim SC, Hasan N, Podhajska AJ (1991) Class-II restriction enzymes-- a review. *Gene*. **100**:13-26.
- ⁹² Bresnick EH, Dalman FC, Sanchez, Pratt WB (1989) Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem*. **264**(9): 4992-4997
- ⁹³ Nielsen CJ, Vogel WM, Pratt WB (1977) Inactivation of glucocorticoid receptors in cell-free preparations of rat liver. *Cancer Res*. **37**: 3420-3426
- ⁹⁴ Wikstrom AC (2003) Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. *J Endocrinol*. **178**(3):331-7
- ⁹⁵ Widen C, Zilliacus J, Gustafsson JA, Wikstrom AC (2000) Glucocorticoid receptor interaction with 14-3-3 and Raf-1, a proposed mechanism for cross-talk of two signal transduction pathways. *J Biol Chem* **275**(50):39296-39301
- ⁹⁶ Bresnick EH, Dalman FC, Pratt WB. (1990) Direct stoichiometric evidence that the untransformed Mr 300,000, 9S, glucocorticoid receptor is a core unit derived from a larger heteromeric complex. *Biochemistry*. **29**(2):520-7
- ⁹⁷ Diehl EE, Schmidt TJ (1993) Heat shock protein 70 is associated in substoichiometric amounts with the rat hepatic glucocorticoid receptor. *Biochemistry*. **32**(49):13510-5

- ⁹⁸ Rafestin-Oblin ME, Couette B, Radanyi C, Lombes M, Baulieu EE (1989) Mineralocorticosteroid receptor of the chick intestine. Oligomeric structure and transformation. *J Biol Chem* **264**(16): 9304-9309
- ⁹⁹ Binart N, Lombes M, Rafestin-Oblin ME, Beaulieu EE (1991) Characterization of human mineralocorticosteroid receptor expressed in the baculovirus system. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(23): 10681-10685
- ¹⁰⁰ Alnemri ES, Maksymowych AB, Robertson NM, Litwack G (1991) Overexpression and characterization of the human mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem* **266**(27): 18072-18081
- ¹⁰¹ Pratt WB (1992) Control of steroid receptor function and cytoplasmic-nuclear transport by heat shock proteins. *Bioessays*. **14**(12):841-8.
- ¹⁰² Caamano CA, Morano MI, Patel PD, Watson SJ, Akil U (1993) A bacterially expressed mineralocorticoid receptor is associated in vitro with the 90-kilodalton heat shock protein and shows typical hormone- and DNA-binding characteristics. *Biochemistry* **32**(33): 8589-8595
- ¹⁰³ Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* **18**(3):306-60
- ¹⁰⁴ Bresnick EH, Dalman FC, Sanchez ER, Pratt WB (1989) Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* **264**(9):4992-7
- ¹⁰⁵ Scherrer LC, Dalman FC, Massa E, Meshinchi S, Pratt WB (1990) Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor- HSP90 complex *J. Biol. Chem.* **265**(35): 21397-21400
- ¹⁰⁶ Bruner KL, Derfoul A, Robertson NM, Guerriero G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Litwack G (1997) The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept Signal Transduct.* **7**(2): 85-98

- ¹⁰⁷ Sanchez ER, Faber LE, Henzel WJ, Pratt WB (1990) The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with both the 70- and 90-kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry* **29**(21): 5145-5152
- ¹⁰⁸ Schowalter DB, Sullivan WP, Maihle NJ, Dobson AD, Conneely OM, O'Malley BW, Toft DO. (1991) Characterization of progesterone receptor binding to the 90- and 70-kDa heat shock proteins. *J Biol Chem.* **266**(31):21165-73
- ¹⁰⁹ Beck FX, Neuhofer W, Muller E. (2000) Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol.* **279**(2):F203-15.
- ¹¹⁰ Liang P, MacRae TH. (1997) Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci.* **110** (13):1431-40
- ¹¹¹ Hutchison KA, Czar MJ, Scherrer LC, Pratt WB (1992) Monovalent cation selectivity for ATP-dependent association of the glucocorticoid receptor with HSP70 and HSP90 *J. Biol. Chem.* **267**(20): 14047-14053
- ¹¹² Hutchison KA, Dittmar KD, Czar MJ, Pratt WB (1994) Proof that HSP70 is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a heterocomplex with HSP90 *J. Biol. Chem.* **269**(7): 5043-5049
- ¹¹³ Dittmar KD, Hutchison KA, Owens-Grillo JK, Pratt WB (1996) Reconstitution of the Steroid Receptor-HSP90 Heterocomplex Assembly System of Rabbit Reticulocyte Lysate *J. Biol. Chem.* **271**(22): 12833-12839
- ¹¹⁴ Hutchison KA, Stancato LF, Owens-Grillo JK, Johnson JL, Krishna P, Toft DO, Pratt WB (1995) The 23-kDa Acidic Protein in Reticulocyte Lysate Is the Weakly Bound Component of the Hsp Foldosome That Is Required for Assembly of the Glucocorticoid Receptor into a Functional Heterocomplex with HSP90. *J. Biol. Chem.* **270**(32): 18841-18847
- ¹¹⁵ Freeman BC, Felts SJ, Toft DO, Yamamoto KR. (2000) The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies. *Genes Dev.* **14**(4): 422-34
- ¹¹⁶ Martinez-Yamout MA, Venkitakrishnan RP, Preece NE, Kroon G, Wright PE, Dyson HJ. (2006) Localization of sites of interaction between 23 and HSP90 in solution. *J Biol Chem* **28**(20): 14457-14464

- ¹¹⁷ Wochnik GM, Young JC, Schmidt U, Holsboer F, Hartl FU, Rein T (2004) Inhibition of GR-mediated transcription by p23 requires interaction with HSP90. *FEBS Lett.* **560**(1-3):35-8.
- ¹¹⁸ Sullivan W, Stensgard B, Caucutt G, Bartha B, McMahon N, Alnemri ES, Litwack G, Toft D (1997) Nucleotides and two functional states of HSP90. *J Biol Chem.* **272**(12):8007-12.
- ¹¹⁹ Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU (1998) In vivo function of HSP90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol.* **143**(4):901-10
- ¹²⁰ Freeman BC, Yamamoto KR (2002) Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science.* **296**(5576):2232-5
- ¹²¹ Hallahan C, Young DA, Munck A. (1973) Time course of early events in the action of glucocorticoids on rat thymus cells in vitro. Synthesis and turnover of a hypothetical cortisol-induced protein inhibition of glucose metabolism and of a presumed ribonucleic acid. *J Biol Chem.* **248**(8):2922-7.
- ¹²² Joly EC, Tremblay E, Tanguay RM, Wu Y, Bibor-Hardy V (1994) TRiC-P5, a novel TCP1-related protein, is localized in the cytoplasm and in the nuclear matrix. *J Cell Sci.* **107**(10): 2851-9
- ¹²³ Lewis SA, Tian G, Vainberg IE, Cowan NJ. (1996) Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. *J Cell Biol.* **132**(1-2):1-4.
- ¹²⁴ Eggers DK, Welch WJ, Hansen WJ (1997) Complexes between nascent polypeptides and their molecular chaperones in the cytosol of mammalian cells. *Mol Biol Cell.* **8**(8):1559-73
- ¹²⁵ Rommelaere H, Van Troys M, Gao Y, Melki R, Cowan NJ, Vandekerckhove J, Ampe C. (1993) Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t-complex polypeptide 1 and seven related subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(24):11975-9.
- ¹²⁶ Sternlicht H, Farr GW, Sternlicht ML, Driscoll JK, Willison K, Yaffe MB (1993) The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(20):9422-6.

- ¹²⁷ Llorca O, Martin-Benito J, Grantham J, Ritco-Vonsovici M, Willison KR, Carrascosa JL, Valpuesta JM (2001) The 'sequential allosteric ring' mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin. *EMBO J.* **20**(15):4065-75
- ¹²⁸ Srikakulam R, Winkelmann DA (1999) Myosin II folding is mediated by a molecular chaperonin. *J Biol Chem.* **274**(38):27265-73
- ¹²⁹ Farr GW, Scharl EC, Schumacher RJ, Sonddek S, Horwich AL (1997) Chaperonin-mediated folding in the eukaryotic cytosol proceeds through rounds of release of native and nonnative forms. *Cell.* **89**(6):927-37
- ¹³⁰ Won KA, Schumacher RJ, Farr GW, Horwich AL, Reed SI (1998) Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT. *Mol Cell Biol.* **18**(12):7584-9
- ¹³¹ Thulasiraman V, Yang CF, Frydman J (1999) In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment. *EMBO J.* **18**(1):85-95
- ¹³² Valpuesta JM, Martin-Benito J, Gomez-Puertas P, Carrascosa JL, Willison KR. (2002) Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS Lett.* **529**(1):11-6.
- ¹³³ Siegers K, Bolter B, Schwarz JP, Bottcher UM, Guha S, Hartl FU (2003) TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes. *EMBO J.* **22**(19):5230-40
- ¹³⁴ Wells CA, Dingus J, Hildebrandt JD. (2006) Role of the chaperonin CCT/TRiC complex in G protein betagamma-dimer assembly. *J Biol Chem.* **281**(29):20221-32
- ¹³⁵ Kubota S, Kubota H, Nagata K (2006) Cytosolic chaperonin protects folding intermediates of Gbeta from aggregation by recognizing hydrophobic beta-strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(22):8360-5
- ¹³⁶ Gebauer M, Melki R, Gehring U (1998) The chaperone cofactor Hop/p60 interacts with the cytosolic chaperonin-containing TCP-1 and affects its nucleotide exchange and protein folding activities. *J Biol Chem.* **273**(45):29475-80
- ¹³⁷ McCallum CD, Do H, Johnson AE, Frydman J. (2000) The interaction of the chaperonin tailless complex polypeptide 1 (TCP1) ring complex (TRiC) with ribosome-bound nascent chains examined using photo-cross-linking. *J Cell Biol.* **149**(3):591-602

- ¹³⁸ Kubo T, Mizobata T, Kawata Y (1993) Refolding of yeast enolase in the presence of the chaperonin GroE. The nucleotide specificity of GroE and the role of GroES. *J Biol Chem.* **268**(26):19346-51
- ¹³⁹ Kawata Y, Nosaka K, Hongo K, Mizobata T, Nagai J (1994) Chaperonin GroE and ADP facilitate the folding of various proteins and protect against heat inactivation. *FEBS Lett.* **345**(2-3):229-32
- ¹⁴⁰ Badcoe IG, Smith CJ, Wood S, Halsall DJ, Holbrook JJ, Lund P, Clarke AR (1991) Binding of a chaperonin to the folding intermediates of lactate dehydrogenase. *Biochemistry.* **30**(38):9195-200
- ¹⁴¹ Naletova IN, Muronetz VI, Schmalhausen EV (2006) Unfolded, oxidized, and thermoinactivated forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interact with the chaperonin GroEL in different ways. *Biochim Biophys Acta.* **1764**(4):831-8
- ¹⁴² Jalaguier S, Mornet D, Mesnier D, Leger JJ, Auzou G. (1996) Human mineralocorticoid receptor interacts with actin under mineralocorticoid ligand modulation. *FEBS Lett.* **384**(2): 112-6
- ¹⁴³ Golestaneh N, Klein C, Valamanesh F, Suarez G, Agarwal MK, Mirshahi M. (2001) Mineralocorticoid receptor-mediated signaling regulates the ion gated sodium channel in vascular endothelial cells and requires an intact cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun.* **280**(5):1300-6
- ¹⁴⁴ Koyasu S, Nishida E, Kadowako T, Matsuzaki F, Iida K, Harada F, Kasuga M, Sakai H, Yahara I (1986) Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**(21): 8054-8058
- ¹⁴⁵ Nishida E, Koyasu S, Sakai H, Yahara (1986) Calmodulin-regulated binding of the 90-kDa heat shock protein to actin filaments. *J Biol Chem* **261**(34): 16033-16036
- ¹⁴⁶ Kellermayer M, Csermely P. (1995) ATP induces dissociation of the 90 kDa heat shock protein (HSP90) from F-actin: interference with the binding of heavy meromyosin. *Biochem Biophys Res Commun* **211**(1): 166-174
- ¹⁴⁷ Green LA, Liem RK (1989) Beta-internexin is a microtubule-associated protein identical to the 70-kDa heat-shock cognate protein and the clathrin uncoating ATPase. *J Biol Chem.* **264**(26):15210-5

- ¹⁴⁸ Redmond T, Sanchez ER, Bresnick EH, Schlesinger MJ, Toft DO, Pratt WB, Welsh MJ. (1989) Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur J Cell Biol.* **50**(1):66-75
- ¹⁴⁹ Fostinis Y, Theodoropoulos PA, Gravanis A, Stournaras C (1992) Heat shock protein HSP90 and its association with the cytoskeleton: a morphological study. *Biochem Cell Biol.* **70**(9):779-86
- ¹⁵⁰ Czar MJ, Welsh MJ, Pratt WB. (1996) Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur J Cell Biol.* **70**(4):322-30
- ¹⁵¹ Miyata Y, Yahara I (1991) Cytoplasmic 8 S glucocorticoid receptor binds to actin filaments through the 90-kDa heat shock protein moiety. *J Biol Chem* **266**(14): 8779-8783
- ¹⁵² Pratt WB (1993) The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **268**(29): 21455-21458
- ¹⁵³ Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robson CN. (2000) Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol.* **14**(10):1618-26
- ¹⁵⁴ Ouporov IV, Knull HR, Thomasson KA (1999) Brownian dynamics simulations of interactions between aldolase and G- or F-actin. *Biophys J.* **76**(1):17-27
- ¹⁵⁵ Clarke FM, Masters CJ. (1975) On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* **381**(1):37-46.
- ¹⁵⁶ Ronai Z. (1993) Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. *Int J Biochem.* **25**(7):1073-6
- ¹⁵⁷ Waingeh VF, Gustafson CD, Kozliak EI, Lowe SL, Knull HR, Thomasson KA. (2006) Glycolytic enzyme interactions with yeast and skeletal muscle F-actin. *Biophys J.* **90**(4):1371-84.
- ¹⁵⁸ Wang J, Morris AJ, Tolan DR, Pagliaro L (1996) The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants. *J Biol Chem.* **271**(12):6861-5

- ¹⁵⁹ Arnold H, Henning R, Pette D. (1971) Quantitative comparison of the binding of various glycolytic enzymes to F-actin and the interaction of aldolase with G-actin. *Eur J Biochem.* **22**(1):121-6
- ¹⁶⁰ Kao AW, Noda Y, Johnson JH, Pessin JE, Saltiel AR (1999) Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem.* **274**(25):17742-7
- ¹⁶¹ Carr D, Knull H. (1993) Aldolase-tubulin interactions: removal of tubulin C-terminals impairs interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* **195**(1):289-93
- ¹⁶² Karkhoff-Schweizer R, Knull HR. (1987) Demonstration of tubulin-glycolytic enzyme interactions using a novel electrophoretic approach. *Biochem Biophys Res Commun.* **146**(2):827-31
- ¹⁶³ Arnold H, Pette D. (1968) Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle. *Eur J Biochem.* **6**(2):163-71
- ¹⁶⁴ Pancholi V. (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci.* **58**(7):902-20.
- ¹⁶⁵ Iida H, Yahara I (1984) Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase. *Nature* **315**, 688 - 690
- ¹⁶⁶ Sirover MA (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* **1432**(2):159-84.
- ¹⁶⁷ Sirover MA (1996) Minireview. Emerging new functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *Life Sci.* **58**(25):2271-7.
- ¹⁶⁸ Schmitz HD, Bereiter-Hahn J. (2002) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase associates with actin filaments in serum deprived NIH 3T3 cells only. *Cell Biol Int.* **26**(2):155-64
- ¹⁶⁹ Glaser PE, Han X, Gross RW (2002) Tubulin is the endogenous inhibitor of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoform that catalyzes membrane fusion: Implications for the coordinated regulation of glycolysis and membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(22):14104-9.

- ¹⁷⁰ Svedruzic ZM, Spivey HO. (2006) Interaction between mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and L-lactate dehydrogenase from heart and muscle. *Proteins* **63**(3):501-11
- ¹⁷¹ Koshy B, Matilla T, Burright EN, Merry DE, Fischbeck KH, Orr HT, Zoghbi HY. (1996) Spinocerebellar ataxia type-1 and spinobulbar muscular atrophy gene products interact with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Hum Mol Genet.* **5**(9):1311-8
- ¹⁷² Russell PJ, Williams A, Amador X, Vargas R (2004) Aldolase and actin protect rabbit muscle lactate dehydrogenase from ascorbate inhibition. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **19**(1):91-8
- ¹⁷³ Poglazov BF, Livanova NB (1986) Interaction of actin with the enzymes of carbohydrate metabolism. *Adv Enzyme Regul.* **25**:297-305
- ¹⁷⁴ Bronstein WW, Knull HR (1981) Interaction of muscle glycolytic enzymes with thin filament proteins. *Can J Biochem.* **59**(7):494-9
- ¹⁷⁵ Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K (2004) Interaction of D-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: implication for an alternative function of Dld2p. *Biochem Biophys Res Commun.* **319**(1):78-82.
- ¹⁷⁶ Wang JC, Stafford JM, Scott DK, Sutherland C, Granner DK (2000) The molecular physiology of hepatic nuclear factor 3 in the regulation of gluconeogenesis. *J Biol Chem.* **275**(19):14717-21
- ¹⁷⁷ Granner D, Pilkis S. (1990) The genes of hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem* **265**(18):10173-6
- ¹⁷⁸ Imai E, Stromstedt PE, Quinn PG, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Granner DK. (1990) Characterization of a complex glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.* **10**(9):4712-9
- ¹⁷⁹ Magnuson MA, Quinn PG, Granner DK (1987) Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-chloramphenicol acetyltransferase fusion genes. Insulin's effects oppose those of cAMP and dexamethasone. *J Biol Chem.* **262**(31):14917-20

- ¹⁸⁰ Argaud D, Zhang Q, Pan W, Maitra S, Pilkis SJ, Lange AJ. (1996) Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: gene structure and 5'-flanking sequence. *Diabetes*. **45**(11):1563-71
- ¹⁸¹ Liu G, Grifman M, Keily B, Chatterton JE, Staal FW, Li QX (2006) Mineralocorticoid receptor is involved in the regulation of genes responsible for hepatic glucose production. *Biochem Biophys Res Commun*. **342**(4):1291-6
- ¹⁸² Boivin D, Bilodeau D, Beliveau R. (1995) Immunochemical characterization of L-isoaspartyl-protein carboxyl methyltransferase from mammalian tissues. *Biochem J*. **309** (3):993-8
- ¹⁸³ Gingras D, Boivin D, Beliveau R. (1994) Asymmetrical distribution of L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferases in the plasma membranes of rat kidney cortex. *Biochem J*. **297**(1):145-50
- ¹⁸⁴ Galletti P, Ingrosso D, Manna C, Clemente G, Zappia V. (1995) Protein damage and methylation-mediated repair in the erythrocyte. *Biochem J*. **306**(2):313-25.
- ¹⁸⁵ Chavous DA, Jackson FR, O'Connor CM (2001) Extension of the Drosophila lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**(26):14814-14818
- ¹⁸⁶ Zhu Y, Qi C, Cao WQ, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK (2001) Cloning and characterization of PCMT, a protein with a methyltransferase domain, which interacts with and enhances nuclear receptor coactivator PRIP function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(18):10380-5.
- ¹⁸⁷ Misra P, Qi C, Yu S, Shah SH, Cao WQ, Rao MS, Thimmapaya B, Zhu Y, Reddy JK. (2002) Interaction of PCMT with transcriptional coactivators CBP, p300, and PBP differential role in transcriptional regulation. *J Biol Chem*. **277**(22):20011-9.
- ¹⁸⁸ Haas RC, Korenfeld C, Zhang ZF, Perryman B, Roman D, Strauss AW (1989) Isolation and characterization of the gene and cDNA encoding human mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem*. **264**(5):2890-7
- ¹⁸⁹ Foucault G, Vacher M, Cribier S, Arrio-Dupont M. (2000) Interactions between beta-enolase and creatine kinase in the cytosol of skeletal muscle cells. *Biochem J*. **346**(1):127-3

- ¹⁹⁰ Singh P, Salih M, Leddy JJ, Tuana BS. (2004) The muscle-specific calmodulin-dependent protein kinase assembles with the glycolytic enzyme complex at the sarcoplasmic reticulum and modulates the activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Ca²⁺/calmodulin-dependent manner. *J Biol Chem.* **279**(34):35176-82.
- ¹⁹¹ Janssen GM, van Damme HT, Kriek J, Amons R, Moller W (1994) The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia*. Why two alpha-chains in this complex? *J Biol Chem.* **269**(50):31410-7
- ¹⁹² Sanders J, Brandsma M, Janssen GM, Dijk J, Moller W (1996) Immunofluorescence studies of human fibroblasts demonstrate the presence of the complex of elongation factor-1 beta gamma delta in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* **109**(5):1113-7
- ¹⁹³ Janssen GM, Moller W (1988) Elongation factor 1 beta gamma from *Artemia*. Purification and properties of its subunits. *Eur J Biochem.* **171**(1-2):119-29
- ¹⁹⁴ Koonin EV, Mushegian AR, Tatusov RL, Altschul SF, Bryant SH, Bork P, Valencia A (1994) Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain--study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. *Protein Sci.* **3**(11):2045-54.
- ¹⁹⁵ Van Damme H, Amons R, Janssen G, Moller W (1991) Mapping the functional domains of the eukaryotic elongation factor 1 beta gamma. *Eur J Biochem.* **197**(2):505-11
- ¹⁹⁶ Jorgensen R, Merrill AR, Andersen GR (2006) The life and death of translation elongation factor 2. *Biochemical Society Transaction* **34**(1):1-6
- ¹⁹⁷ Gavrilova LP, Rutkevitch NM, Gelfand VI, Motuz LP, Stahl J, Bommer UA, Bielka H (1987) Immunofluorescent localization of protein synthesis components in mouse embryo fibroblasts. *Cell Biol Int Rep.* **11**(10):745-53
- ¹⁹⁸ Yang F, Demma M, Warren V, Dharmawardhane S, Condeelis J (1990) Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1a. *Nature* **347**(6292):494-6
- ¹⁹⁹ Owen CH, DeRosier DJ, Condeelis J (1992) Actin crosslinking protein EF-1a of *Dictyostelium discoideum* has a unique bonding rule that allows square-packed bundles. *J Struct Biol.* **109**(3):248-54

- ²⁰⁰ Gross SR, Kinzy TG (2005) Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nat Struct Mol Biol.* **12(9):772-8.**
- ²⁰¹ Matsudaira P (1991) Modular organization of actin crosslinking proteins *Trends Biochem Sci.* **16(3):87-92**
- ²⁰² Edmonds BT (1993) ABP50: an actin-binding elongation factor 1 alpha from *Dictyostelium discoideum.* *J Cell Biochem.* **52(2):134-9**
- ²⁰³ Demma M, Warren V, Hock R, Dharmawardhane S, Condeelis J (1990) Isolation of an abundant 50,000-dalton actin filament bundling protein from *Dictyostelium amoebae.* *J Biol Chem.* **265(4):2286-91**
- ²⁰⁴ Furukawa R, Jinks TM, Tishgarten T, Mazzawi M, Morris DR, Fechheimer M (2001) Elongation factor 1beta is an actin-binding protein. *Biochim Biophys Acta.* **1527(3):130-40**
- ²⁰⁵ Bektas M, Nurten R, Gurel Z, Sayers Z, Bermek E (1994) Interactions of eukaryotic elongation factor 2 with actin: a possible link between protein synthetic machinery and cytoskeleton. *FEBS Lett.* **356(1):89-93.**
- ²⁰⁶ Bektas M, Nurten R, Sayers Z, Bermek E. (1998) Interactions of elongation factor 2 with the cytoskeleton and interference with DNase I binding to actin. *Eur J Biochem.* **256(1):142-7.**
- ²⁰⁷ Marchesi VT, Ngo N. (1993) In vitro assembly of multiprotein complexes containing alpha, beta, and gamma tubulin, heat shock protein HSP70, and elongation factor 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90(7):3028-32**
- ²⁰⁸ Flaherty KM, McKay DB, Kabsch W, Holmes KC (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88(11):5041-5.**
- ²⁰⁹ Browne GJ, Proud CG (2002) Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur J Biochem.* **269(22):5360-8.**
- ²¹⁰ Fu Y, Liu HW, Forsythe SM, Kogut P, McConville JF, Halayko AJ, Camoretti-Mercado B, Solway J. (2000) Mutagenesis analysis of human SM22: characterization of actin binding. *J Appl Physiol.* **89(5):1985-90.**

- ²¹¹ Kobayashi R, Kubota T, Hidaka H. (1994) Purification, characterization, and partial sequence analysis of a new 25-kDa actin-binding protein from bovine aorta: a SM22 homolog. *Biochem Biophys Res Commun.* **198**(3):1275-80
- ²¹² Prinjha RK, Shapland CE, Hsuan JJ, Totty NF, Mason IJ, Lawson D (1994) Cloning and sequencing of cDNAs encoding the actin cross-linking protein transgelin defines a new family of actin-associated proteins. *Cell Motil Cytoskeleton.* **28**(3):243-55
- ²¹³ Shapland C, Hsuan JJ, Totty NF, Lawson D (1993) Purification and properties of transgelin: a transformation and shape change sensitive actin-gelling protein. *J Cell Biol.* **121**(5): 1065-1073
- ²¹⁴ Dammeier S, Lovric J, Eulitz M, Kolch W, Mushinski JF, Mischak H (2000) Identification of the smooth muscle-specific protein, sm22, as a novel protein kinase C substrate using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis.* **21**(12):2443-53.
- ²¹⁵ Fujii T, Hiromori T, Hamamoto M, Suzuki T. (1997) Interaction of chicken gizzard smooth muscle calponin with brain microtubules. *J Biochem (Tokyo).* **122**(2):344-51
- ²¹⁶ Fattoum A, Roustan C, Smyczynski C, Der Terrossian E, Kassab R (2003) Mapping the microtubule binding regions of calponin. *Biochemistry.* **42**(5):1274-82
- ²¹⁷ Bogatcheva NV, Ma Y, Urosev D, Gusev NB (1999) Localization of calponin binding sites in the structure of 90 kDa heat shock protein (Hsp90) *FEBS Lett.* **457**(3):369-74
- ²¹⁸ Ma Y, Bogatcheva NV, Gusev NB. (2000) Heat shock protein (hsp90) interacts with smooth muscle calponin and affects calponin-binding to actin. *Biochim Biophys Acta.* **1476**(2):300-10
- ²¹⁹ Mecham RP. (1991) Receptors for laminin on mammalian cells. *FASEB J.* **5**(11):2538-46
- ²²⁰ Yaffe MB (2002) How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* **513**(1):53-7
- ²²¹ Aitken A, Baxter H, Dubois T, Clokie S, Mackie S, Mitchell K, Peden A, Zemlickova E. (2002) Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem Soc Trans.* **30**(4):351-60.

- ²²² Christina Widén (2005) Thesis. Studies of glucocorticoid receptor interacting proteins
- ²²³ Bridges D, Moorhead GB (2004) 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE*. **242**:re10
- ²²⁴ Kjarland E, Keen T J, Kleppe R. (2006) Does Isoform Diversity Explain Functional Differences in the 14-3-3Protein Family? *Current Pharmaceutical Biotechnology* **7**(3): 217-223
- ²²⁵ Angrand PO, Segura I, Volkel P, Ghidelli S, Terry R, Brajenovic M, Vintersten K, Klein R, Superti-Furga G, Drewes G, Kuster B, Bouwmeester T, Acker-Palmer A. (2006) Transgenic mouse proteomics identifies new 14-3-3 associated proteins involved in cytoskeletal rearrangements and cell signaling. *Mol Cell Proteomics*. **5**(12):2211-2227
- ²²⁶ Pozuelo Rubio M, Geraghty KM, Wong BH, Wood NT, Campbell DG, Morrice N, Mackintosh C. (2004) 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J*. **379**(2):395-408.
- ²²⁷ Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, Metalnikov P, O'Donnell P, Taylor P, Taylor L, Zougman A, Woodgett JR, Langeberg LK, Scott JD, Pawson T (2004) Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol*. **14**(16):1436-50.
- ²²⁸ Gohla A, Bokoch GM (2002) 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Curr Biol*. **12**(19):1704-10.
- ²²⁹ Birkenfeld J, Betz H, Roth D (2003) Identification of cofilin and LIM-domain-containing protein kinase 1 as novel interaction partners of 14-3-3 zeta. *Biochem J*. **369**(1):45-54
- ²³⁰ Gelperin D, Weigle J, Nelson K, Roseboom P, Irie K, Matsumoto K, Lemmon S. (1995) 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**(25):11539-43.
- ²³¹ Roth D, Birkenfeld J, Betz H (1999) Dominant-negative alleles of 14-3-3 proteins cause defects in actin organization and vesicle targeting in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. **460**(3):411-6.

- ²³² Takahashi S, Wakui H, Gustafsson JA, Zilliacus J, Itoh H. (2000) Functional interaction of the immunosuppressant mizoribine with the 14-3-3 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **274**(1):87-92
- ²³³ Wakui H, Wright AP, Gustafsson J, Zilliacus J (1997) Interaction of the ligand-activated glucocorticoid receptor with the 14-3-3 η protein *J. Biol. Chem.* **272**(13): 8153-8156
- ²³⁴ Zilliacus J, Holter E, Wakui H, Tazawa H, Treuter E, Gustafsson JA (2001) Regulation of glucocorticoid receptor activity by 14-3-3-dependent intracellular relocalization of the corepressor RIP140. *Mol Endocrinol.* **15**(4):501-11
- ²³⁵ Groyer A, Schweizer-Groyer G, Cadepond F, Mariller M, Baulieu EE (1987) Antigluco-corticosteroid effects suggest why steroid hormone is required for receptors to bind DNA in vivo but not in vitro. *Nature* **328**(6131):624-6
- ²³⁶ Denis M, Gustafsson JA (1989) Translation of glucocorticoid receptor mRNA in vitro yields a nonactivated protein. *J. Biol. Chem.* **264**(11):6005-8.
- ²³⁷ Leach KL, Dahmer MK, Hammond ND, Sando JJ, Pratt WB 1979 Molybdate inhibition of glucocorticoid receptor inactivation and transformation. *J Biol Chem.* **254**(23):11884-90
- ²³⁸ Kim YS, Jang SW, Sung HJ, Lee HJ, Kim IS, Na DS, Ko J (2005) Role of 14-3-3 ϵ as a positive regulator of the glucocorticoid receptor transcriptional activation. *Endocrinology.* **146**(7):3133-40
- ²³⁹ Galigniana MD (1998) Native rat kidney mineralocorticoid receptor is a phosphoprotein whose transformation to a DNA-binding form is induced by phosphatases. *Biochem J.* **333**(3):555-63
- ²⁴⁰ Suginta W, Karoulias N, Aitken A, Ashley RH (2001) Chloride intracellular channel protein CLIC4 (p64H1) binds directly to brain dynamin I in a complex containing actin, tubulin and 14-3-3 isoforms. *Biochem J.* **359**(1):55-64.
- ²⁴¹ Shang Y, Brown M. (2002) Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science.* **295**(5564):2465-8.
- ²⁴² Couette B, Lombes M, Baulieu EE, Rafestin-Oblin ME (1992) Aldosterone antagonists destabilize the mineralocorticosteroid receptor. *Biochem J.* **282**(3):697-702

- ²⁴³ Rafestin-Oblin ME, Lombes M, Couette B, Baulieu EE. (1992) Differences between aldosterone and its antagonists in binding kinetics and ligand-induced hsp90 release from mineralocorticosteroid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **41**(3-8):815-21
- ²⁴⁴ Allan GF, Leng X, Tsai SY, Weigel NL, Edwards DP, Tsai MJ, O'Malley BW. (1992) Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J Biol Chem.* **267**(27):19513-20
- ²⁴⁵ Couette B, Fagart J, Jalaguier S, Lombes M, Souque A, Rafestin-Oblin ME. (1996) Ligand-induced conformational change in the human mineralocorticoid receptor occurs within its hetero-oligomeric structure. *Biochem J.* **315**(2):421-7
- ²⁴⁶ Hansen PR, Rieneck K, Bendtzen K. (2004) Spironolactone inhibits production of proinflammatory cytokines by human mononuclear cells. *Immunol Lett.* **91**(2-3):87-91
- ²⁴⁷ Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. (2002) Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol.* **161**(5):1773-81
- ²⁴⁸ Sanz-Rosa D, Cediél E, de las Heras N, Miana M, Balfagon G, Lahera V, Cachofeiro V (2005) Participation of aldosterone in the vascular inflammatory response of spontaneously hypertensive rats: role of the NFkappaB/IkappaB system. *J Hypertens.* **23**(6):1167-72
- ²⁴⁹ Bendtzen K, Hansen PR, Rieneck K; The Spironolactone/Arthritis Study Group (2003) Spironolactone inhibits production of proinflammatory cytokines, including tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma, and has potential in the treatment of arthritis. *Clin Exp Immunol.* **134**(1):151-8
- ²⁵⁰ Sonder SU, Woetmann A, Odum N, Bendtzen K (2006) Spironolactone induces apoptosis and inhibits NF-kappaB independent of the mineralocorticoid receptor. *Apoptosis.* **11**(12):2159-65
- ²⁵¹ Mueller A, Steinmetz PR. (1978) Spironolactone. An aldosterone agonist in the stimulation of H⁺ secretion by turtle urinary bladder. *J Clin Invest.* **61**(6):1666-70
- ²⁵² Massaad C, Lombés M, Aggerbeck M, Rafestin-Oblin ME, Barouki R (1997) Cell-specific, promoter-dependent mineralocorticoid agonist activity of spironolactone. *Mol Pharmacol* **51**(2): 285-292

- ²⁵³ Bureik M, Bruck N, Hubel K, Bernhardt R (2005) The human mineralocorticoid receptor only partially differentiates between different ligands after expression in fission yeast. *FEMS Yeast Res.* **5**(6-7):627-33
- ²⁵⁴ Halenz DR, Feng JY, Hegre CS, Lane MD. (1962) Some enzymic properties of mitochondrial propionyl carboxylase. *J Biol Chem.* **237**(7):2140-7
- ²⁵⁵ Lamhonwah AM, Mahuran D, Gravel RA. (1989) Human mitochondrial propionyl-CoA carboxylase: localization of the N-terminus of the pro- and mature alpha chains in the deduced primary sequence of a full-length cDNA. *Nucleic Acids Res.* **17**(11):4396.
- ²⁵⁶ Kalousek F, Darigo MD, Rosenberg LE (1980) Isolation and characterization of propionyl-CoA carboxylase from normal human liver. Evidence for a protomeric tetramer of nonidentical subunits. *J Biol Chem.* **255**(1):60-5
- ²⁵⁷ Kraus JP, Kalousek F, Rosenberg LE (1983) Biosynthesis and mitochondrial processing of the beta subunit of propionyl coenzyme A carboxylase from rat liver. *J Biol Chem.* **258**(12):7245-8
- ²⁵⁸ Shiraishi A, Yamada Y, Tsuura Y, Fijimoto S, Tsukiyama K, Mukai E, Toyoda Y, Miwa I, Seino Y (2001) A novel glucokinase regulator in pancreatic beta cells: precursor of propionyl-CoA carboxylase beta subunit interacts with glucokinase and augments its activity. *J Biol Chem.* **276**(4):2325-8
- ²⁵⁹ Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM Jr, Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins JW (2004) Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(12):4130-5
- ²⁶⁰ Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. (2004) Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **286**(6):E1011-22
- ²⁶¹ Solakidi S, Psarra AM, Sekeris CE (2005) Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochim Biophys Acta.* **1745**(3):382-92
- ²⁶² Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, Sekeris CE. (2005) Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod.* **20**(12):3481-7

- 263 Morrish F, Buroker NE, Ge M, Ning XH, Lopez-Guisa J, Hockenbery D, Portman MA. (2006) Thyroid hormone receptor isoforms localize to cardiac mitochondrial matrix with potential for binding to receptor elements on mtDNA. *Mitochondrion*. **6(3):143-8**
- 264 Scheller K, Seibel P, Sekeris CE. (2003) Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Int Rev Cytol* .**222:1-61**
- 265 Scheller K, Sekeris CE, Krohne G, Hock R, Hansen IA, Scheer U. (2000) Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. *Eur J Cell Biol*. **79(5):299-307**
- 266 Laitusis AL, Brostrom MA, Brostrom CO (1999) The Dynamic Role of GRP78/BiP in the Coordination of mRNA Translation with Protein Processing: *J Biol Chem* **274(1): 486-493**
- 267 Vogel JP, Misra LM, Rose MD (1990) Loss of Bip/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J. Cell Biol.* **110**, 1885-1895
- 268 Hendershot LM, Ting J, Lee AS (1988) Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000 Dalton glucose-regulated protein and the role of posttranslational modifications in its binding function. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4250-4256
- 269 Hutchison KA, Dittmar KD, Stancato LF, Pratt WB. (1996) Ability of various members of the hsp70 family of chaperones to promote assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with hsp90. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **58(3):251-8**
- 270 Ray S, Hou X, Zhou HE, Wang H, Das SK (2006) Bip is a molecular link between the phase I and phase II estrogenic responses in uterus. *Mol Endocrinol.* **20(8):1825-37**
- 271 Piwien-Pilipuk G, Ayala A, Machado A, Galigniana MD (2002) Impairment of Mineralocorticoid Receptor (MR)- dependent Biological Response by Oxidative Stress and Aging. *J Biol Chem* **277(14): 11886-11903**
- 272 Galigniana MD (2000) *Curr Top Steroid Res* **3: 1-22**
- 273 Mihailidou AS, Mardini M, Fraser T, Knights D, Funder JW, (2004) Agonist/antagonist activity of cortisol in cardiomyocyte mineralocorticoid receptors is determined by redox state. In: 30th Annual Meeting of the International Aldosterone Conference. p.18
- 274 Voges D, Zwickl P, Baumeister W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.***68:1015-68**

- ²⁷⁵ Wilk S, Orlowski M. (1983) Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem.* **40**(3):842-9.
- ²⁷⁶ Meng L, Mohan R, Kwok BH, Eloffson M, Sin N, Crews CM. (1999) Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(18):10403-8
- ²⁷⁷ Groll M, Kim KB, Kairies N, Huber R, Crews CM (2000) Crystal structure of epoxomicin: 20S proteasome reveals a molecular basis for selectivity of α `, β `-epoxyketone proteasome inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**: 1237-1238
- ²⁷⁸ Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci.* **21**(7):267-71
- ²⁷⁹ Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG (2002) Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab.* **13**(2):55-60
- ²⁸⁰ Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**(6634):733-6.
- ²⁸¹ Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR. (1998) Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.* **12**(21):3343-56.
- ²⁸² Ding XF, Anderson CM, Ma H, Hong H, Uht RM, Kushner PJ, Stallcup MR (1998) Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP 1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol Endocrinol* **12**(2): 302-313
- ²⁸³ Jaffe IZ, Mendelsohn ME. (2005) Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res.* **96**(6):643-50
- ²⁸⁴ Blaxall BC, Miano JM, Berk BC. (2005) Angiotensin II: a devious activator of mineralocorticoid receptor-dependent gene expression. *Circ Res.* **96**(6):610-1
- ²⁸⁵ Pascual-Le Tallec L, Simone F, Viengchareun S, Meduri G, Thirman MJ, Lombes M (2005) The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Mol Endocrinol.* **19**(5):1158-69

- 286 Bratton MR, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Subauste JS. (2004) The myosin binding protein is a novel mineralocorticoid receptor binding partner. *Mol Cell Endocrinol.* **217**(1-2):221-7
- 287 Grossmann C, Benesic A, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Gassner B, Gekle M (2005) Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol.* **19**(7):1697-710.
- 288 Yang J, DeFranco DB (1996) Assessment of glucocorticoid receptor-heat shock protein 90 interactions in vivo during nucleocytoplasmic trafficking. *Mol Endocrinol.* **10**(1):3-13
- 289 Bresnick EH, Dalman FC, Pratt WB. (1990) Direct stoichiometric evidence that the untransformed Mr 300,000, 9S, glucocorticoid receptor is a core unit derived from a larger heteromeric complex. *Biochemistry.* **29**(2):520-7
- 290 Smith DF, Faber LE, Toft DO (1990) Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins *J Biol Chem.* **265**(7):3996-4003.
- 291 Diehl EE, Schmidt TJ (1993) Heat shock protein 70 is associated in substoichiometric amounts with the rat hepatic glucocorticoid receptor. *Biochemistry.* **32**(49):13510-5
- 292 Murphy PJ, Morishima Y, Chen H, Galigniana MD, Mansfield JF, Simons SS Jr, Pratt WB (2003) Visualization and mechanism of assembly of a glucocorticoid receptor.Hsp70 complex that is primed for subsequent Hsp90-dependent opening of the steroid binding cleft. *J Biol Chem.* **278**(37):34764-73
- 293 Picard D, Yamamoto KR (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **6**(11):3333-40
- 294 Walther RF, Atlas E, Carrigan A, Rouleau Y, Edgecombe A, Visentin L, Lamprecht C, Addicks GC, Hache RJ, Lefebvre YA. (2005) A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J Biol Chem.* **280**(17):17549-61
- 295 Galigniana MD, Scruggs JL, Herrington J, Welsh MJ, Carter-Su C, Housley PR, Pratt WB. (1998) Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Mol Endocrinol.* **12**(12):1903-13

- ²⁹⁶ Hache RJ, Tse R, Reich T, Savory JG, Lefebvre YA (1999) Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* **274**(3):1432-9
- ²⁹⁷ Madan AP, DeFranco DB. (1993) Bidirectional transport of glucocorticoid receptors across the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(8):3588-92.
- ²⁹⁸ Smith DF (1993) Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol Endocrinol.* **7**(11):1418-29
- ²⁹⁹ Baumann CT, Maruvada P, Hager GL, Yen PM. (2001) Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. Multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J Biol Chem.* **276**(14):11237-45
- ³⁰⁰ Maruvada P, Baumann CT, Hager GL, Yen PM (2003) Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem.* **278**(14):12425-32
- ³⁰¹ Guiochon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Appianat M, Milgrom E. (1991) Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.* **10**(12):3851-9.
- ³⁰² Dauvois S, White R, Parker MG. (1993) The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci.* **106** (4):1377-88.
- ³⁰³ Nagaki K, Yamamura H, Shimada S, Saito T, Hisanaga S, Taoka M, Isobe T, Ichimura T. (2006) 14-3-3 Mediates phosphorylation-dependent inhibition of the interaction between the ubiquitin E3 ligase Nedd4-2 and epithelial Na⁺ channels. *Biochemistry.* **45**(21):6733-40
- ³⁰⁴ Ichimura T, Yamamura H, Sasamoto K, Tominaga Y, Taoka M, Kakiuchi K, Shinkawa T, Takahashi N, Shimada S, Isobe T. (2005) 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na⁺ channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* **280**(13):13187-94
- ³⁰⁵ Liang X, Peters KW, Butterworth MB, Frizzell RA. (2006) 14-3-3 isoforms are induced by aldosterone and participate in its regulation of epithelial sodium channels. *J Biol Chem.* **281**(24):16323-32.
- ³⁰⁶ Bens M, Chassin C, Vandewalle A. (2006) Regulation of NaCl transport in the renal collecting duct: lessons from cultured cells. *Pflugers Arch.* **453**(2):133-46

- ³⁰⁷ Snyder PM. (2005) Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endocrinology*. **146**(12):5079-85
- ³⁰⁸ Kasinath BS, Mariappan MM, Sataranatarajan K, Lee MJ, Feliars D. (2006) mRNA Translation: Unexplored Territory in Renal Science. *J Am Soc Nephrol*. **17**(12):3281-92
- ³⁰⁹ Mullick J, Anandatheerthavarada HK, Amuthan G, Bhagwat SV, Biswas G, Camasamudram V, Bhat NK, Reddy SE, Rao V, Avadhani NG (2001) Physical interaction and functional synergy between glucocorticoid receptor and Ets2 proteins for transcription activation of the rat cytochrome P-450c27 promoter. *J Biol Chem*. **276**(21):18007-17
- ³¹⁰ Wang JM, Prefontaine GG, Lemieux ME, Pope L, Akimenko MA, Hache RJ (1999) Developmental effects of ectopic expression of the glucocorticoid receptor DNA binding domain are alleviated by an amino acid substitution that interferes with homeodomain binding. *Mol Cell Biol*. **19**(10):7106-22
- ³¹¹ Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, Consler TG, Parks DJ, Stewart EL, Willson TM, Lambert MH, Moore JT, Pearce KH, Xu HE. (2002) Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* **110**(1):93-105.
- ³¹² Pascual-Le Tallec L, Simone F, Viengchareun S, Meduri G, Thirman MJ, Lombes M (2005) The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Mol Endocrinol*. **19**(5):1158-69
- ³¹³ Thenot S, Henriquet C, Rochefort H, Cavailles V. (1997) Differential interaction of nuclear receptors with the putative human transcriptional coactivator hTIF1. *J Biol Chem* **272**(18): 12062-8
- ³¹⁴ Tallec LP, Kirsh O, Lecomte MC, Viengchareun S, Zennaro MC, Dejean A, Lombes M. (2003) Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Mol Endocrinol* **17**(12): 2529-42