

11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen in der Cortison/Cortisol-Umwandlung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Jochen Stegk

Kiel, 2013

Erster Gutacher: Herr Prof. Dr. Edmund Maser

Zweiter Gutachter: Herr Prof. Dr. Eric Beitz

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2013

Zum Druck genehmigt: 29.10.13

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit

11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen
in der Cortison/Cortisol-Umwandlung

nach Inhalt und Form, abgesehen von der Beratung durch die Betreuer, selbstständig von mir erstellt wurde und ihre Inhalte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden sind.

Diese Arbeit wurde weder vollständig noch in Teilen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, August 2013

Jochen Stegk

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Maser für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung anzufertigen, und für die Freiheiten, die er mir bei der Gestaltung gewährt hat.

Herrn Prof. Dr. Beitz danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Hans-Jörg Martin möchte ich für die fürsorgliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeit danken.

Ebenso gilt größter Dank meinen „Adoptivbetreuern“ und Zimmerkollegen Frau Dr. Bettina Ebert und Herrn Kisiela für ihre fachliche und seelische Unterstützung. Frau Dr. Bettina Ebert danke ich zudem für die Durchführung der Zellversuche und Herrn Michael Kisiela für die Hilfe bei den zahlreichen bioinformatischen Fragen.

Gruß und Dank auch an meine Brüder im Geiste, Jan Hintzpeter und Dr. Yasser El-Hawari. Es gibt mehr als nur den Elfenbeinturm. Danke für die Aufrechterhaltung dieser Erkenntnis.

Ferner möchte ich mich bei den tätigen und ehemaligen Angestellten des Instituts bedanken, die mit ihrer freundlichen Art vieles so viel einfacher gemacht haben. Zu nennen sind insbesondere Sigrid Ulrich, Sabine Seibert, Katrin Köbsch, Mohammed Azozz, Elli Kubach, Gryta Ohlsen und Nicole Newiger.

Und auch meinen Leidensgenossinnen Claudia Stapelfeld und Christine Lörz gilt mein Dank für das kameradschaftliche Beisammensein.

Die Dankbarkeit gegenüber meinen Eltern und meiner Partnerin Kerstin lasse ich zum Schluss nahezu unerwähnt. Sie ist nicht in Worte zu fassen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Jochen Stegk

Hamburger Chaussee 124

24113 Kiel

Geburtstag: 31. März 1979

Geburtsort: Brunsbüttel

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch



Schul- und Hochschulbildung

2007 – 2013 Promotion im Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2003 – 2007 Hauptstudium und Diplomarbeit im Fach Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zum Thema „Herstellung und Charakterisierung von funktionalisierten Nanodiamant-Materialien für biologische Anwendungen“

2001 – 2003 Grundstudium der Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

1998 – 2001 Studium der Rechtswissenschaften an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

1998 Abitur am Gymnasium Brunsbüttel

Praktische Tätigkeit

2009 – 2012 Anstellung als wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Rechtsmedizin -Abteilung forensische Toxikologie- am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

Bisherige Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden vorab in den folgenden wissenschaftlichen Artikeln veröffentlicht:

- J. Stegk, B. Ebert, H.-J. Martin, E. Maser, "Expression profiles of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases Type 1 and Type 2 in inflammatory bowel diseases", *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, 301, 104-108.
- C. A. Staab, J. Stegk, S. Haenisch, E. Neiss, K. Köbsch, B. Ebert, I. Cascorbi, E. Maser, "Analysis of alternative promoter usage in expression of HSD11B1 including the development of a transcript-specific quantitative real-time PCR method", *Chem. Biol. Interact.* **2011**, 91, 104-112.

Weitere Referierte Publikationen

- A. Krueger, Y. Liang, G. Jarre, J. Stegk, "Surface functionalisation of detonation diamond suitable for biological applications", *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 2322-2328.
- A. Krueger, M. Ozawa, G. Jarre, Y. Liang, J. Stegk, L. Lu, "Deagglomeration and functionalisation of detonation diamond", *Phys. Stat. Sol. A* **2007**, 204, 2881-2887.
- A. Krueger, J. Stegk, Y. Liang, L. Lu, G. Jarre, "Functionalised nanodiamond: Biotinylation of detonation diamond", *Langmuir* **2008**, 24, 4200-4204.
- F. Westphal, Th. Junge, L. Radünz, J. Stegk, G. Rochholz, "Characterization of pentoxyverine metabolites in urine using GC/MS after intoxication with Silomat® cough drops", *Forensic science international.* **2011**, 215, 124-135.

Ausgewählte Posterpräsentationen

- J. Stegk, B. Ebert, H.-J.Martin, E. Maser, “Expression profiles of 11 β -HSD1 in small intestine of patients suffering from inflammatory bowel diseases”, *14th International Meeting on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Kranjska Gora, Slowenien*, Juli **2008**.
- M. Kisiela, Y. El-Hawari, B. Ebert, A. Göhler, J. Stegk, G. Xiong, E. Maser, “Hydroxysteroid-dehydrogenases as molecular switch for steroid action in marine bacteria and in human medicine”, *Cluster Retrieve Future Ocean, Salzaau*, März **2009**.
- C. A. Staab, J. Stegk, S. Haenisch, E. Neiß, B. Ebert, I. Cascorbi, E. Maser, “Alternative promoter usage in expression of HSD11B1 - Development of a transcript-specific quantitative Real-Time PCR method”, *15th International Meeting on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Lexington, USA*, Juli **2010**.
- J. Stegk, F. Westphal, Th. Junge, L. Radünz, A. Neusüß, G. Rochholz, “Characterization of pentoxifyverine and its metabolites in urine using GC/MS after intoxication with Silomat® cough drops”, *48th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), Bonn*, August/September **2010**.

Zusammenfassung

Neben seiner anti-inflammatorischen Wirkung spielt das Steroidhormon Cortisol eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Stoffwechselfvorgängen im menschlichen Körper. Das Enzym 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD 1) erzeugt Cortisol durch Umsetzung der inaktiven Ketoform Cortison. Als Folge steht der Zelle in Stresssituationen und während Entzündungsreaktionen mehr Cortisol zur Verfügung. Da das Enzym zusätzlich am Fremdstoffmetabolismus beteiligt ist und Fehlregulationen mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht werden, ist die 11 β -HSD 1 trotz umfangreichen Untersuchungen in der Vergangenheit noch immer ein interessantes Ziel weiterer Forschungen. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD 2) wiederum katalysiert die Umsetzung von Cortisol zu inaktivem Cortison. Dies geschieht bevorzugt in Zielgewebe des Mineralcorticoid-Rezeptors, um diesen frei für die Bindung von Aldosteron zu halten. Zusätzlich ist kürzlich in einer Veröffentlichung von der Überexpression und Aufreinigung der 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 3 (11 β -HSD 3) berichtet worden. Auch für dieses Enzym konnte eine Umsetzung von Cortisol zu Cortison gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Untersuchungen der Expressionslevel der Enzyme 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2 in entzündetem Darmgewebe von Patienten mit den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eine signifikante Hochregulation des Typ 1-Enzyms begleitet von einer erniedrigten Regulation des Typ 2-Enzyms gegenüber nicht-entzündetem Gewebe gezeigt werden. Diese Änderungen der Expressionen ermöglichen in den betroffenen Zellen entsprechende Effekte auf Proteinebene, die für eine erhöhte Bereitstellung von anti-inflammatorischem Cortisol sorgen könnten. Interessanterweise war der Effekt auf die Regulation der 11 β -HSD 1 bei männlichen Patienten deutlich stärker ausgeprägt, was seine Ursache eventuell in höheren Konzentrationen des ebenfalls anti-inflammatorisch wirkenden Estrogens bei Frauen findet.

Die Existenz von zwei Promotoren, P1 und P2, im Gen des Enzyms 11 β -HSD 1 ist ein noch wenig untersuchter Aspekt der Regulation der 11 β -HSD 1. Die Promotoren vermitteln die Expression unterschiedlicher

Transkriptvarianten, die das gleiche Protein kodieren. Es gelang für diese Arbeit zwei Real-Time-PCR-Assays zu konzipieren, die in der Lage sind, die einzelnen Transkriptvarianten zu quantifizieren. Messungen mit Proben von menschlicher Leber und Fettgewebe zeigten ausschließlich das P2-Transkript. In Lungenproben fand sich zusätzlich das P1-Transkript, jedoch in deutlich geringeren Mengen im Vergleich zum P2-Transkript. Da es sich bei den untersuchten Proben um Gewebetypen handelt, die viel 11 β -HSD 1 exprimieren, lassen die Ergebnisse die Vermutung zu, dass dauerhaft erhöhte Expressionen über den Promotor 2 erfolgen. Dem Promotor 1 kommt eventuell die Aufgabe zu, kurzfristig erhöhte, zusätzliche Expressionen zu vermitteln.

Da bei den sich anschließenden Untersuchungen von Krebszelllinien stets sehr geringe Expressionslevel von 11 β -HSD 1 gefunden wurden, stellte sich die Frage, ob eine Hypermethylierung dafür ursächlich sein könnte. In Zellversuchen wurden die Zelllinien A431 und HT-29 mit dem Demethylierungsreagenz 5-Azacytidin behandelt. Es konnte eine Hochregulation der 11 β -HSD 1 und des Glucocorticoid-Rezeptors gezeigt werden, deren Effekte sich jedoch nicht auf Proteinebene durchzusetzen schienen.

Die Klonierung, Überexpression und Aufreinigung einer homologen 11 β -HSD 1 des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* gelang in Form eines *Nus-Tag*-gekoppelten Proteins. Bei umfangreichen Untersuchungen ließ sich jedoch kein Substrat finden.

Bei der Klonierung der immer noch weitgehend unerforschten 11 β -HSD 3 gelang die Überexpression und Aufreinigung von zwei unterschiedlichen Transkriptvarianten des Enzyms in Form von unterschiedlichen Fusionsproteinen. Eine zuvor publizierte Darstellung eines löslichen *Trx-Tag*-gebundenen Proteins mit Aktivität gegenüber Cortisol konnte nicht bestätigt werden. Bei zusätzlich durchgeführten, umfangreichen Substratuntersuchungen ließ sich ebenfalls kein Umsatz feststellen.

Abstract

Besides its anti-inflammatory effects cortisol plays a crucial role in the mediation of metabolic processes in the human body. The enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD 1) generates cortisol by conversion of the inactive ketoform cortisone. As a result, more cortisol is available for the cell in conditions of stress or inflammation. Even after extensive studies the 11 β -HSD 1 is still of great interest in ongoing research because of its participation in xenobiotic metabolism and due to the fact that a misregulation of the enzyme is connected to a multitude of diseases. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD 2) catalyzes the conversion of cortisol to inactive cortisone, typically in target tissues of the mineralocorticoid receptor, thus preventing the unwanted binding of cortisol. Recently, the overexpression and purification of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (11 β -HSD 3) has been published. The recombinant enzyme was reported to catalyze the oxidation of cortisol to cortisone.

In this thesis transcription levels of 11 β -HSD 1 and 11 β -HSD 2 were investigated in colon tissue of patients suffering from the inflammatory-bowel diseases ulcerative colitis and Crohn's disease. In inflamed tissue the type 1-enzyme was significantly upregulated whereas the type 2-enzyme was downregulated compared to non-inflamed tissue. These data support the idea of higher levels of anti-inflammatory cortisol in these tissues. Interestingly, the upregulation of 11 β -HSD 1 was more pronounced in male patients compared to female patients which might be based on higher levels of anti-inflammatory estrogens in female patients.

The existence of two promoters, P1 and P2, upstream of the gene of 11 β -HSD 1 is a poorly investigated aspect in terms of gene regulation. The promoters mediate the expression of different transcripts coding for the same protein. Two real-time-PCR-assays were designed which are able to quantify the transcripts. Assessments of samples of human liver and adipose tissue showed exclusively the P2-transcript. In lung samples the P1-transcript was found, too, but only in amounts significantly smaller than that of P2. Due to the fact that the investigated samples are from tissues typically expressing high amounts of 11 β -HSD 1, the results lead to the hypothesis that

permanently elevated expression is mediated by the P2-promoter. A possible function of the P1-promoter could be the mediation of an additional short-term elevation of expression.

Since the investigations of tumor cell lines revealed only very low transcript levels of 11 β -HSD 1 the question arose whether hypermethylation could explain this result. After treating the cell lines A431 and HT-29 with the demethylation agent 5-azacytidine, upregulation of 11 β -HSD 1 and the glucocorticoid receptor could be detected. However, neither of these results was found on the protein level.

Cloning, overexpression and purification of a homologue 11 β -HSD 1 from the model organism *Caenorhabditis elegans* resulted in a soluble *Nus-Tag* bound protein. Extensive searches of putative substrates were not successful.

After cloning the still insufficiently explored 11 β -HSD 3, two transcripts could be overexpressed and purified as soluble fusion proteins. A recently published activity towards cortisol oxidation could not be detected with these constructs. Additional screens yielded no putative substrates.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Cortison / Cortisol	1
1.2	Die Enzymsuperfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen / Reduktasen	3
1.3	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1	3
1.4	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2	5
1.5	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 3	6
1.6	Aufgabenstellung	8
2	MATERIAL UND GERÄTE	10
2.1	Chemikalien und Reinsubstanzen	10
2.2	Kommerziell bezogene Plasmide	11
2.3	Medien, Puffer und Stammlösungen	11
2.4	Expressionsvektoren	14
2.5	Bakterienstämme	15
2.6	Zelllinien	15
2.7	Polymerasen	15
2.7.1	Phire Hot Start DNA Polymerase	16
2.7.2	Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase	16
2.7.3	KAPA2G™ Robust DNA Polymerase	16
2.8	Antikörper	16
2.9	Restriktionsenzyme	17
2.10	Oligonukleotide/Primer	17
2.11	Geräte	17
2.11.1	Zentrifugen	17

2.11.2	Autoklav	17
2.11.3	SpeedVac	18
2.11.4	Agarose- und SDS-Geldokumentation	18
2.11.5	HPLC	18
2.11.6	FPLC-Anlage für die Nickel-Affinitätschromatographie	18
2.11.7	pH-Meter	18
2.11.8	PCR-Cycler	19
2.11.9	Real-Time Cycler	19
2.11.10	Dispergiergerät	19
2.11.11	Zell-Homogenisator	19
2.11.12	Photometer	19
2.11.13	Ultraschallhorn	19
2.11.14	French Press	19
2.11.15	Pyrosequenziergerät	19
3	ZELLKULTUR	20
3.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	20
3.2	Genexpressionsstudie: Behandlung mit 5-Azacytidin (5 µM) für 72 h	20
3.3	Langzeitbehandlung mit 5-Azacytidin (2,5 µM) und Effekte auf Proteinexpression und Methylierungsmuster	22
4	METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE	23
4.1	Polymerase-Kettenreaktion	23
4.2	Agarose-Gelelektrophorese	23
4.3	Gewinnung von genomischer DNA	23
4.4	Bisulfitbehandlung von genomischer DNA	24
4.5	Pyrosequenzierung	25
4.6	cDNA-Gewinnung	26
4.6.1	cDNA aus Zellen	26
4.6.2	cDNA aus Lungengewebe	26
4.6.3	cDNA aus Darmgewebe	27

4.7	Quantitative Real-Time-RT-PCR.....	27
4.7.1	Relative Quantifizierung.....	27
4.7.1.1	Relative Quantifizierung in Proben von Patienten mit CED.....	28
4.7.1.2	Relative Quantifizierung in Zellproben nach Behandlung mit 5-Azacytidin .	28
4.7.2	Absolute Quantifizierung.....	28
4.7.2.1	Design von Real-Time-PCR-Sonden zur Quantifizierung der Transkriptvarianten der 11 β -HSD 1.....	28
4.7.2.2	Bestimmung der Spezifität und der Effizienz der designten Real-Time-PCR-Sonden.....	29
4.8	Klonierung.....	30
4.8.1	DNA-Reinigung.....	30
4.8.1.1	DNA-Reinigung von PCR-Produkten.....	30
4.8.1.2	DNA-Reinigung von Restriktionsansätzen.....	30
4.8.1.3	Plasmid-Isolierung.....	31
4.8.2	Schnittstellen-PCR.....	31
4.8.3	Restriktionsverdau.....	31
4.8.4	Ligation.....	32
4.8.5	Mutagenese.....	32
4.8.6	Transformation.....	32
4.8.6.1	Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen.....	32
4.8.6.2	Transformation von Bakterien mit einem Ligationsansatz.....	33
4.8.6.3	Transformation von Bakterien mit gereinigtem Plasmid.....	33
4.8.7	Kolonie-PCR.....	33
4.8.8	Sequenzierung.....	34
5	METHODEN DER PROTEINBIOCHEMIE.....	35
5.1	Präparation von Lebermikrosomen.....	35
5.2	Aktivitätsbestimmung von 11β-HSD 1 in Mikrosomen.....	35
5.3	Überexpression und Proteinreinigung.....	35
5.3.1	Vorkultur.....	35
5.3.2	Überexpression.....	36
5.3.3	Bakterien-Zellaufschluss.....	36
5.3.3.1	Bakterien-Zellaufschluss mittels Ultraschall.....	36

5.3.3.2	Bakterien-Zellaufschluss mit einer French Press.....	36
5.3.4	Proteinreinigung / Nickel-Affinitätschromatographie.....	37
5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
5.5	SDS-Gelelektrophorese	38
5.5.1	SDS-Gelelektrophorese nach Überexpression.....	38
5.5.2	SDS-Gelelektrophorese Zellversuche	38
5.6	Western-Blot.....	39
5.7	Thrombinverdau	39
5.8	Substratuntersuchungen	40
5.8.1	Substratuntersuchung HPLC	40
5.8.1.1	Cortison / Cortisol.....	41
5.8.1.2	Metyrapon	41
5.8.1.3	Oracin.....	41
5.8.2	Substratscreening durch die photometrische Messung der Änderung der NAD(P)H-Konzentration.....	42
5.8.3	Substratscreening durch die fluorimetrische Messung der Änderung der NAD(P)H-Konzentration.....	42
6	ERGEBNISSE	45
6.1	Untersuchung von Biopsiematerial von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	45
6.1.1	11 β -HSD 1- und 11 β -HSD 2-Expression bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	46
6.1.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression von 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2	48
6.2	Entwicklung von Real-Time-PCR-Assays für die Transkriptvarianten P1 und P2 der 11β-HSD 1.....	49
6.2.1	Sonden für quantitative Real-Time-RT-PCR	49
6.2.2	Untersuchung der Transkriptvarianten P1 und P2 in humanen Gewebeproben mittels entwickeltem Real-Time-PCR-Assay	54
6.3	Genexpressionsstudie: Zellversuche mit 5-Azacytidin	54

6.3.1	Bestimmung der Regulation von 11 β -HSD 1, 2 und GR in A431- und HT-29-Zellen mittels quantitativer Real-Time-RT-PCR.....	57
6.3.2	Bestimmung des mittleren Methylierungsgrads der gDNA des GR nach Behandlung mit 5-Azacytidin	61
6.3.3	Bestimmung der Proteinmenge von 11 β -HSD 1 mittels Western-Blot	62
6.4	Klonierung der 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 3	63
6.4.1	Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante E	64
6.4.1.1	Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante E in pET-15b.....	65
6.4.1.2	Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante E in pET-32b.....	66
6.4.1.3	Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante E in pET-42b.....	68
6.4.1.4	Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante E in pET-43b.....	69
6.4.2	Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante B	73
6.4.2.1	Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante B in pET-15b.....	73
6.4.2.2	Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante B in pET-32b.....	73
6.4.2.3	Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante B in pET-43b.....	77
6.5	Klonierung einer homologen 11β-HSD 1 aus <i>Caenorhabditis elegans</i>	80
6.5.1	Bioinformatische Vorarbeiten.....	80
6.5.2	Klonierung einer homologen 11 β -HSD 1 aus <i>C. elegans</i>	81
7	DISKUSSION UND AUSBLICK.....	85
7.1	Untersuchungen zur Regulation der Enzyme 11β-HSD 1 und 11β-HSD 2	85
7.1.1	Untersuchung von Biopsiematerial von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	85
7.1.2	Entwicklung von Real-Time-PCR-Assays für die Transkriptvarianten P1 und P2 der 11 β -HSD 1	89
7.1.3	Genexpressionsstudie: Zellversuche mit 5-Azacytidin	92
7.2	Klonierung und Charakterisierung der 11β-HSD 3 und einer homologen 11β-HSD 1 aus <i>Caenorhabditis elegans</i>	95
7.2.1	Klonierung der 11 β -HSD 3.....	95
7.2.1.1	Klonierung der Transkriptvariante E.....	95
7.2.1.2	Klonierung der Transkriptvariante B.....	96
7.2.1.3	Ausblick für die Klonierung der 11 β -HSD 3	98
7.2.2	Klonierung einer homologen 11 β -HSD 1 aus <i>Caenorhabditis elegans</i>	99

8	LITERATURVERZEICHNIS	101
9	ANHANG	111
9.1	PCR-Temperaturprogramme	111
9.1.1	Temperaturprogramme bei herkömmlicher PCR.....	111
9.1.2	Temperaturprogramme bei der quantitativen Real-Time-RT-PCR.....	112
9.2	Verwendete Oligonukleotide	113
9.3	Substratliste	114
9.3.1	Substrate HPLC	114
9.3.2	Substrate.....	115

Abkürzungsverzeichnis

11 β -HSD	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase
BSA	Bovines Serumalbumin
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
E. coli	Escherichia coli
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: Fetal Calf Serum)
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
H6PDH	Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HPLC	Engl.: High Performance Liquid Chromatography
IL-1 β	Interleukin-1 β
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KBE	Kolonie bildende Einheit
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	Nuklearfaktor- κ B
OD _{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
PBS	Salinischer Phosphatpuffer (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIPA	Engl.: Radio Immuno Precipitation Assays
RT	Raumtemperatur
SDR	kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (engl.: short-chain dehydrogenases/reductases)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: Single Nucleotide Polymorphism)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Abkürzungen.

1 Einleitung

Die Grundlage des Lebens ist der kontinuierliche Ablauf einer Vielzahl von chemischen Reaktionen. Enzyme als Biokatalysatoren sind in Organismen unabdingbar, um diese lebenserhaltenden Reaktionen in endlicher Zeit unter nahezu konstanten Reaktionsbedingungen ablaufen zu lassen. Ohne Mitwirken von Enzymen würde ein Großteil der im Körper stattfindenden Reaktionen bei der gegebenen Körpertemperatur des jeweiligen Organismus nicht ausreichend schnell ablaufen, um eine Lebenserhaltung zu gewährleisten.

1.1 Cortison / Cortisol

Das Glucocorticoid Cortisol wird in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde synthetisiert und sezerniert [1]. Das Steroidhormon bindet innerhalb der Zelle an den Glucocorticoid-Rezeptor (GR), der durch die Ligandenbindung seine Konformation verändert und ein Inhibitor-Proteinkomplex abspaltet [2;3]. Der dadurch aktivierte Rezeptor transloziert im Anschluss in den Zellkern, um dort nach Dimerisierung die Transkription zahlreicher Gene zu regulieren. Auf diese Weise fördert Cortisol nicht nur die Gluconeogenese sowie die Glykogenbildung sondern steigert auch den Fett- und Proteinabbau [4]. Von großer Bedeutung ist auch die anti-inflammatorische Wirkung von Cortisol, die via Repression des Transkriptionsfaktors Nuklearfaktor- κ B (NF- κ B) [5-7] und der daraus resultierenden Reduzierung von pro-inflammatorischen Cytokinen vermittelt wird [8]. Der Plasmacortisolspiegel unterliegt einer circadianen Rhythmik. Zusätzlich wird der intrazelluläre Cortisolspiegel durch das Zusammenspiel der Enzyme 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 und Typ 2 variiert, die das aktive Glucocorticoid Cortisol aus inaktivem Cortison generieren (Typ 1) bzw. die Rückreaktion katalysieren (Typ 2) (siehe Abb. 1.1).

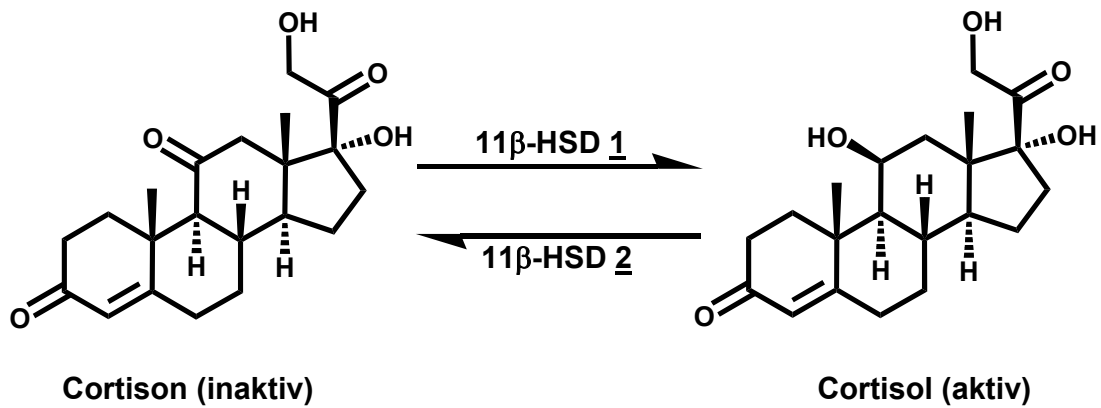


Abb. 1.1: Umwandlung von aktivem Cortisol zu inaktivem Cortison und umgekehrt durch die Enzyme 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 und Typ 2.

Dieser auch als „Cortison-Cortisol-Shuttle“ bezeichnete Vorgang ermöglicht es, die Zelle in Stress- oder Entzündungssituationen lokal mit zusätzlichem Cortisol zu versorgen und verdeutlicht die Bedeutung der beiden Enzyme im Entzündungsgeschehen (siehe auch Abb. 1.2) [5;9-12].

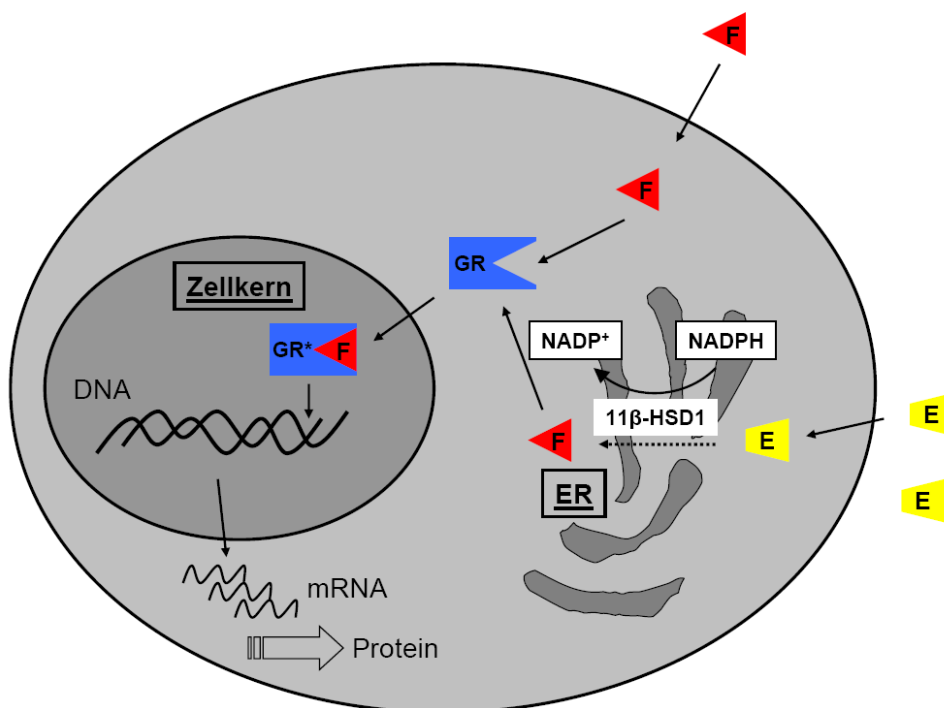


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der zusätzlichen intrazellulären Bereitstellung von Cortisol (F) aus Cortison (E) durch die 11 β -HSD 1. Aktives Cortisol bindet an den Glucocorticoid-Rezeptor (GR), der dadurch aktiviert wird (GR*) und in den Zellkern transloziert, wo er die Transkription zahlreicher Gene reguliert (Abbildung nach [13]).

Chronisch erhöhte Glucocorticoid-Level führen zu Fettsucht und zum sogenannten Cushing-Syndrom und werden weiter mit der Entwicklung von Typ 2-Diabetes und des Metabolischen Syndroms in Verbindung gebracht [14-18].

1.2 Die Enzymsuperfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen / Reduktasen

Die Enzyme 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1, 2 und 3 gehören zur Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen / Reduktasen (*engl. Short-chain dehydrogenases / reductases, SDR*), die aus Enzymen mit durchschnittlich 250 bis 350 Aminosäuren besteht. Sie umfasst über 47 000 Exemplare aus allen bisher untersuchten Genomen und gehört damit zu einer der größten Enzym-Superfamilien [19-22]. SDRs sind NAD(P)(H)-abhängige Oxidoreduktasen und zeigen gemeinsame Sequenzmotive bei der Kofaktorbindestelle sowie der katalytische Triade bestehend aus Tyrosin, Lysin und Serin. Im Menschen sind bereits über achtzig SDR-Gene identifiziert, die eine Rolle im Metabolismus von Steroidhormonen, Prostaglandinen, Retinoiden, Lipiden und Xenobiotika spielen [22].

1.3 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1

Die physiologische Aufgabe des Enzyms 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD 1) ist die Generierung von aktivem Cortisol aus inaktivem Cortison [23-25]. Der Name 11 β -HSD 1 ergibt sich aus der Umsetzung von Cortison an der Position 11 im Steroidgerüst. Die Bezeichnung „ β “ gibt hierbei die räumliche Orientierung der beteiligten Hydroxygruppe an. 11 β -HSD 1 zeigt *in vivo* ausschließlich reduzierende Wirkung. Verantwortlich hierfür ist die räumliche Nähe zum Enzym Hexose-6-Phosphat Dehydrogenase (H6PDH) innerhalb des endoplasmatischen Reticulums [26-28], wo 11 β -HSD 1 durch eine N-terminale lipophile Domäne in der Membran verankert ist [29;30]. Durch H6PDH wird kontinuierlich der zur Reduktion durch Wasserstoff-Übertragung benötigte Kofaktor

Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) generiert und somit die Richtung der Reaktion bestimmt [30].

Das menschliche Enzym besteht aus 292 Aminosäuren und ist hauptsächlich in Glucocorticoid-Zielorganen wie Leber, Lunge, Fettgewebe, Gonaden, Hypophyse und Kleinhirn exprimiert [31-33].

Die Gewinnung des gereinigten Enzyms zeigt sich als relativ aufwendig. Die Reinigung von nativem Enzym aus Leber beinhaltet mehrere chromatographische Schritte und bedingt ausreichend Ausgangsmaterial [34]. Die rekombinante Herstellung und Reinigung des kompletten humanen Enzyms im aktiven Status ist in *Escherichia coli*, bislang nicht gelungen. Versuche der Herstellung mit abgeschnittenem Membrananker waren jedoch ebenso erfolgreich [35] wie die Überexpression und Reinigung des Gesamtproteins in der Hefe *Pichia pastoris* [36;37].

Die Regulation des humanen *HSD11B1*-Gens erfolgt über zwei Promotoren. Wie bei der Maus [38] resultieren daraus mRNAs, die sich nur im Bereich vor dem Translationsstart (*engl.: 5'-Untranslated Region, 5'-UTR*) unterscheiden und dasselbe Protein kodieren. Bislang ist noch unbekannt, ob den Promotoren spezielle Aufgaben zukommen.

Eine Fehlregulation des Enzyms wird mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht. Infolge von erhöhter 11 β -HSD 1-Aktivität kommt es zu erhöhten Cortisol-Leveln mit Folgen wie Fettsucht, Cushing-Syndrom, Metabolisches Syndrom u.a. [14-18;39], was die Inhibition von 11 β -HSD 1 zu einem interessanten therapeutischen Ziel werden lässt [13].

Neben dem physiologischen Substrat Cortison werden durch 11 β -HSD 1 auch xenobiotische Carbonylverbindungen, wie Oracin, Metyrapon und das tabakspezifische Kanzerogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) umgesetzt [40-48].

Entsprechend einer Phase I-Reaktion wird die jeweilige Carbonylgruppe, analog zur Umsetzung von Cortison, zum Alkohol reduziert. Nach der reduktiven Umsetzung durch das Enzym erfolgt in einer Phase II-Reaktion eine Konjugation mit einem hydrophilen Konjugat wie Glucuronsäure, Sulfaten oder z. B. Glutathion. Die renale Ausscheidung und der damit

einhergehende Detoxifizierungsprozeß von ursprünglich lipophileren Substanzen wird somit ermöglicht bzw. begünstigt.

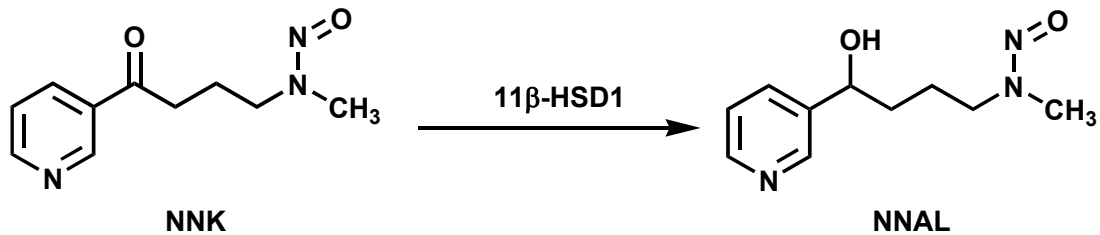


Abb. 1.3: Die Umsetzung des tabakspezifischen Kanzerogens 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) zum entsprechenden Alkohol (NNAL) wird durch 11β-HSD 1 katalysiert.

1.4 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2

Die 11β-HSD 2 katalysiert die oxidative Umsetzung von Cortisol zu Cortison unter Verwendung von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) als Kofaktor [49;50]. Da es bislang nicht gelang, das Enzym in aktiver Form zu isolieren, existieren auch keine Kenntnisse über eventuelle andere nichtsteroidale Substrate [33].

Die menschliche 11β-HSD 2 besteht aus 405 Aminosäuren und kommt vor allem in Schweißdrüsen, der Niere und dem Darm vor [13;51;52], wo es durch die Umsetzung von Cortisol zur Ketoverbindung verhindert, dass dieses an den Mineralcorticoid-Rezeptor (MR) bindet und diesen aktiviert. Der MR zeigt nahezu die gleiche Affinität zu Cortisol wie zu seinem eigentlichen Liganden, dem Mineralcorticoid Aldosteron, dessen Plasmakonzentration jedoch bis zu tausendfach geringer ist, als die von Cortisol. Durch die Umsetzung von Cortisol zu Cortison, welches nicht an den MR bindet, bleibt dieser frei für die Bindung von Aldosteron [53-56]. In der Plazenta ist die 11β-HSD 2 ebenfalls hoch exprimiert und hat dort die Aufgabe, den Fötus vor hohen maternalen Glucocorticoid-Konzentrationen zu schützen [57].

Das Enzym spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung unterschiedlicher Formen des Bluthochdrucks. Bei verringerter oder aufgehobener Aktivität des Typ 2-Enzyms kommt es zur vermehrten Aktivierung des MR durch Cortisol

und Folgen wie Kaliummangel (Hypokaliämie) und Bluthochdruck [12;52]. Ursächlich hierfür können Mutationen im Gen sein, welche ein inaktives bzw. kurzlebigen Protein zur Folge haben. In diesem Fall spricht man von der Erbkrankheit „Apparent Mineralcorticoid Excess“ [58-60]. Aber auch hohe Mengen des Lakritzinhaltsstoffes Glycyrrhetinsäure führen durch Inhibition des Enzyms und der daraus folgenden erhöhten Stimulation des MR durch Cortisol zu entsprechenden Symptomen [52].

Unterschiedliche Studien zeigen ferner eine Herunterregulation durch das Cytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [61;62], was darauf schließen lässt, dass im Entzündungsgeschehen die Desaktivierung von anti-inflammatorischen Cortisol durch das Typ 2-Enzym vermindert wird, um so der Entzündung entgegen zu wirken.

1.5 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 3

Die dritte Isoform der menschlichen 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase ist erst seit verhältnismäßig kurzer Zeit bekannt. Zwar ließen Untersuchungen schon seit den Neunzigerjahren des letzten Jahrhunderts auf die Existenz des Enzyms schließen [63-65], jedoch gelang es Huang *et al.* erst ein Jahrzehnt später das Enzym in *E. coli* überzuexprimieren und aufzureinigen [66].

Das Gen der 11 β -HSD 3 (Bezeichnung HSD11B1L, entsprechend „Hydroxysteroid [11-beta] Dehydrogenase 1-like“) befindet sich auf Chromosom 19 und besteht aus acht Exons. Zu Beginn dieser Arbeit waren in der *GenBank*[®]-Datenbank acht unterschiedliche Transkriptvarianten bekannt, die mit A bis H bezeichnet wurden^a. Die Transkriptvariante E galt zu diesem Zeitpunkt als Leitvariante, die das längste Protein kodiert.

Die von Huang *et al.* überexprimierte und gereinigte Transkriptvariante B zeigte bei photometrischer Messung der Abnahme der Konzentration des Kofaktors NADP⁺ gegenüber Cortisol eine Dehydrogenase-Aktivität. Sehr schwache Aktivität zeigte sich auch bei Verwendung von NAD⁺ als Kofaktor. Die Reduktion von Cortison in Gegenwart der reduzierten Kofaktoren ließ

^a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

sich jedoch nicht detektieren [66], was in Einklang mit vorangegangenen Ergebnissen stand [65].

Die physiologische Aufgabe des Enzyms ist bislang nicht eindeutig geklärt. Jedoch liegt aufgrund der mittels Northern-Blot belegten hohen RNA-Expression der Isoform B im menschlichen Gehirn bei zeitgleicher niedriger Expression der 11 β -HSD 2 und aufgrund der scheinbaren unidirektionalen Aktivität des Enzyms die Vermutung nahe, dass es für die Inaktivierung von Cortisol im Gehirn verantwortlich ist [66]. Da hohe Glucocorticoid-Spiegel mit Beeinträchtigungen der kognitiven Fähigkeiten in Verbindung gebracht werden [67;68], kommt dem Enzym im Gehirn eventuell eine Schutzfunktion zu. Ob die unterschiedlichen Isoformen in anderen Geweben exprimiert werden und ihnen dort andere Aufgaben zukommen ist bislang nicht geklärt.

Evolutionäre Untersuchungen lassen darauf schließen, dass 11 β -HSD 1 ein Paralog von 11 β -HSD 3 ist, also durch Genduplikation aus diesem entstand [69]. In den Genen von Seeigel, Lanzettfischchen und Ciona findet sich 11 β -HSD 3 aber nicht 11 β -HSD 1, welche erst bei entwicklungsgeschichtlich späteren Organismen auftritt [70]. Ferner fehlen in den erwähnten Organismen GR und Glucocorticoide, was ein Indiz dafür ist, dass die 11 β -HSD 3 zu einem früheren Zeitpunkt der Evolution für die Metabolisierung anderer Substrate verantwortlich war [70] und eventuell noch heute zusätzliche Substrate besitzt.

1.6 Aufgabenstellung

Durch das umfangreiche Wirkungsspektrum von Cortisol im menschlichen Körper kommt auch dem Enzym 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase eine entscheidende Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Vorgängen zu. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 katalysiert die Reduktion von Cortison zu Cortisol, Typ 2 katalysiert die oxidative Inaktivierung von Cortisol zu Cortison. Ein in neuerer Zeit entdeckter Typ 3 ist bislang fast nicht charakterisiert. In dieser Arbeit soll mit der Untersuchung der Enzyme auf funktioneller und regulatorischer Ebene ein Beitrag dazu geleistet werden, deren bisher nicht umfassend erforschte Beteiligung im Krankheitsgeschehen besser verstehen zu lernen, da die Fehlregulation von 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2 als ein Faktor bei der Entstehung vieler weitverbreiteter Krankheiten erkannt wurde.

Die Untersuchung der Beteiligung von 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 und Typ 2 am Entzündungsgeschehen sollte mittels Expressionsuntersuchungen mit Proben von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen durchgeführt werden. Insbesondere sollte bestimmt werden, inwiefern sich das Expressionsmuster der beiden Enzyme während der Entzündung verändert, bzw. ob eine vorangehende Fehlregulation der Enzyme und eine daraus resultierende Unterversorgung mit Cortisol als Ursache für das Entzündungsgeschehen infrage kommt.

Der nicht umfassend untersuchte Aspekt der Regulation erhält durch die Existenz eines zweiten Promotors im Gen der 11 β -HSD 1 ein erhöhtes Gewicht. Je nach verwendetem Promotor entstehen unterschiedliche Transkripte, die jedoch dasselbe Protein kodieren. Es sollte versucht werden, für die unterschiedlichen Transkripte einen Real-Time-PCR-Assay zu konzipieren, um eine Quantifizierung zu ermöglichen. Auf diese Weise könnte bestimmt werden, ob die Promotoren eventuell exklusiv oder anteilig unterschiedlichen Aufgaben oder Zielorganen zuzusprechen sind.

Bedingt durch geringe Expressionslevel von 11 β -HSD 1 in Tumorzelllinien stellte sich deren Nutzung als *in-vitro*-Modell als problematisch heraus. Dies gab jedoch den Anstoß zur Erforschung eines weiteren Aspektes der

Regulation: es sollte untersucht werden, ob hier epigenetische Effekte für die niedrigen Expressionslevel verantwortlich sind.

Ferner sollte aufgrund der interessanten gewebespezifischen Expression von 11 β -HSD 3, welche bisher fast nur im Hirngewebe nachgewiesen wurde, und der daraus möglicherweise abzuleitenden Rolle bei der Regulation von kognitiven Funktionen ein besonderer Schwerpunkt der Arbeit auf der rekombinanten Herstellung des Proteins und einer alternativen Variante liegen. Denn die 11 β -HSD 3 wurde erst kürzlich neu entdeckt und ist daher bislang noch nicht ausreichend biochemisch charakterisiert worden.

Aufgrund der problematischen rekombinanten Herstellung in bakteriellen Expressionssystemen und des hohen Aufwands, der mit der Reinigung der nativen humanen 11 β -HSD 1 verbunden ist, sollte zudem versucht werden, ein homologes Protein aus dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* rekombinant herzustellen. Mit diesem ließe sich dann ein Substratscreening im größeren Maßstab vollziehen.

2 Material und Geräte

2.1 Chemikalien und Reinsubstanzen

(1R)-(-)-Campherchinon^b – (1S)-(+)-Campherchinon^b – 1,2-Cyclohexandion^b – 1,2-Naphthochinon^b – 1,3-Cyclohexandion^b – 1,4-Benzochinon^b – 1,4-Naphthochinon^b – 1-Indanon^b – 2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion^b – 2,3-Butandion^b – 2,3-Heptandion^b – 2,3-Hexandion^b – 2,3-Pentandion^b – 2-Benzoylpyridin^b – 2-Chloro-3-pyrrolidino-1,4-naphthochinon^b – 2-Propanol^c – 3,4-Hexandion^b – 3-Benzoylpyridin^b – 3-Methylbutanal^b – 4-Benzoylpyridin^d – 5-Azacytidin^b – 5-Bromoisatin^b – 5-Hydroxy-1,4-Naphthochinon^b – 5-Hydroxymethylfurfural^b – 6x DNA-Loading Dye^e – 7-Hydroxyflavon^b – 9,10-Phenanthrenchinon^b – Acenaphthenchinon^b – Acetaldehyd^b – Acetoin^b – Acetonitril^b – Acetophenon^b – Agarose NEEQ Ultra-Qualität^f – Ammoniaklösung 25%^c – Ampicillin^f – Bradford-Reagenz^b – Butanal^b – Calciumchlorid Dihydrat^c – Carbenicillin^g – Chloramphenicol^b – Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets^l – Coomassie® Brilliant Blue R250^h – Coumarin^b – Curcumin^b – DMEM, high Glucose (4,5 g/L)ⁱ – DMSO^c – Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat^c – dNTP Mix, 10mM each^e – EDTA-Dinatriumsalz^b – Essigsäure^f – Ethanol^j – Ethylacetat^f – Ethylacetoacetat^b – Fetal Bovine Serum Standard Qualityⁱ – Furfural^b – Gel-Red™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000x^k – Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder^e – Gene Ruler 1kb DNA Ladder^e – Glucose-6-Phosphat^b – Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase^l – Glycerin 85%^c – Glycerinaldehyd^b – Harnstoff^b – Hexanal^b – Hydroxyaceton^b – Imidazol^c – IPTG^f – Isatin^b – Kaliumchlorid^f – Kaliumdihydrogenphosphat^c – Kanamycin^m – LB-Medium^f – L-Glutamine, Liquid (200mM)ⁱ – Lysozym^b – Magnesiumchlorid Hexahydrat^c – Manganchlorid Tetrahydrat^b – Menadion^b – Methylglyoxal^b – Methyl-p-Benzochinon^b – Metyrapon^b – Milchpulver^f – MOPS^b – NADP-Dinatriumsalz^f – NADPH-Tetranatriumsalz^b – Naringenin^b – Natriumchlorid^c – Natriumdesoxycholat Monohydrat^b – Natriumdihydrogenphosphat^f – Natrium-Hexansulfonat Monohydrat^b – NEAA Amino Acid Concentrate (100x)ⁱ – Nuclease-Free Waterⁿ – PageRuler Prestained Protein Ladder^e – Phosphorsäure 85%^f – PMSF^b – p-Nitroacetophenon^b – p-Nitrobenzaldehyd^b – Random Primers^o – Rubidiumchlorid^b – SDS ultra pure^f – Spectinomycin^b – TaqMan Gene Expression Master Mix^p – Thrombinⁱ – Trans-1-decalon^b – Triethylamin^b – Tris^b – Triton X-100^c – Trypsin EDTA (10x)ⁱ – Tween® 20^b

^b Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

^c Merck, Darmstadt, Deutschland

^d TCI Europe N.V., Zwijndrecht, Belgien

^e Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

^f Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

^g AppliChem, Darmstadt, Deutschland

^h Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

ⁱ GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA

^j J.T. Baker, Groß-Gerau, Deutschland

^k Biotium, Inc., Hayward, CA, USA

^l Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

^m Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland

ⁿ Qiagen, Hilden, Deutschland

^o Promega, Fitchburg, WI, USA

^p Life Technologies/Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA

2.2 Kommerziell bezogene Plasmide

Als Template für die Klonierungen der unterschiedlichen Proteine dienen folgende kommerziell bezogenen Plasmide:

Was	Name	Hersteller	Vektor
11 β -HSD 3 Transkript E	IMAGE ID:100015977	Source BioScience, Nottingham, UK	pENTR223.1
11 β -HSD 3 Transkript B	LIFESEQ90220519	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	pDRIVE
11 β -HSD 1 P1-Bereich	IMAGp958P211586Q	Source BioScience, Nottingham, UK	pDNR-LIB
11 β -HSD 1 P2-Bereich	IMAGE ID: 4286028	Source BioScience, Nottingham, UK	pDNR-LIB

Tabelle 2: Auflistung der kommerziell bezogenen Klone.

2.3 Medien, Puffer und Stammlösungen

Agar-Platten

Äquivalente Volumina von aufgeschmolzener und zuvor autoklavierter 2% (m/v) Agar-Lösung in Wasser und 2x LB-Medium wurden gemischt und mit 0,1% (v/v) des entsprechenden Antibiotikums versetzt. Anschließend wurde das Gemisch in Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren bei 4°C gelagert.

Ampicillin

100 mg/mL Ampicillin in Wasser, sterilfiltriert (0,22 μ m Sterilfilter); aliquotiert bei -20°C gelagert

Blocking-Puffer für Western-Blot

5% (m/v) Milchpulver in PBS-T-Puffer

Carbenicillin

25 mg/mL Carbenicillin in Wasser, sterilfiltriert (0,22 μ m Sterilfilter); aliquotiert bei -20°C gelagert

Chloramphenicol

34 mg/mL Chloramphenicol in Ethanol, sterilfiltriert (0,22 μ m Sterilfilter); aliquotiert bei -20°C gelagert

Homogenisierungspuffer für Präparation von Lebermikrosomen

250 mM Saccharose; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,4; gelagert bei 4°C

Imidazol-Puffer A für Nickel-Affinitätschromatographie

20 mM NaH₂PO₄; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 10% (v/v) Glycerin; pH 7,4; gelagert bei 4°C

Imidazol-Puffer B für Nickel-Affinitätschromatographie

20 mM NaH₂PO₄; 500 mM NaCl; 500 mM Imidazol; 10% (v/v) Glycerin; pH 7,4; gelagert bei 4°C

IPTG-Lösung

500 mM IPTG in Wasser, sterilfiltriert (0,22 µm Sterilfilter); aliquotiert bei -20°C gelagert

Kanamycin

25 mg/mL Kanamycin in Wasser, sterilfiltriert (0,22 µm Sterilfilter); aliquotiert bei -20°C gelagert

LB-Medium / 2x LB-Medium

25 g bzw. 50 g eines Fertiggemischs (bestehend aus Trypton, NaCl und Hefeextrakt; 2:2:1) wurden in 1 L Wasser aufgeschlämmt, autoklaviert und anschließend bei 4°C gelagert.

NADPH-regenerierendes System

13 mM NADP⁺; 100 mM Glucose-6-Phosphat; 50 mM MgCl₂; 50 mM NaH₂PO₄; 43,75 U/mL Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Oracin-Laufmittel (HPLC)

75/25-Gemisch (v/v) aus Puffer (10 mM Natrium-Hexansulfonat; 50 mM Triethylamin; pH 3,27 [eingestellt mit H₃PO₄]) und Acetonitril

5x PBS-Puffer

40 g NaCl; 1,0 g KCl; 5,75 g Na₂HPO₄*2H₂O; 1,0 g KH₂PO₄; auf 1 L Wasser

PBS-T-Puffer

1% (v/v) Tween® 20 in PBS-Puffer

RIPA-Puffer

50 mM Tris; 150 mM NaCl; 1% (v/v) Triton X-100; 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat; 0,1% (w/v) SDS; 1 mM EDTA; pH 7,4; aliquotiert bei -20°C gelagert

SDS-Färbelösung

10% (v/v) Essigsäure; 0,02% (w/v) Coomassie-Blau

Spectinomycin

25 mg/mL Spectinomycin in Wasser, sterilfiltriert (0,22 µm Sterilfilter); aliquotiert bei -20°C gelagert

Stripping-Puffer

200 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) Tween® 20; pH 2,2; bei -4°C gelagert

Screening-Puffer für Substratscreening

50 mM MOPS; 1 mM MgCl₂; 10% (v/v) Glycerin; 0,01% (v/v) Triton X-100; pH 7,4

50x TAE-Puffer

50 mM EDTA pH 8,0; 2 M Tris; 1 M Eisessig

TFB I-Puffer

10 mM CaCl₂; 15% (v/v) Glycerin; 30 mM Kaliumacetat pH 5,8; 100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; gelagert bei 4°C

TFB II-Puffer

10 mM MOPS pH 7,0; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 15% (v/v) Glycerin; gelagert bei 4°C

Wasser

Wenn nicht anders angegeben wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet.

2.4 Expressionsvektoren

Alle verwendeten Vektoren vermitteln eine Antibiotika-Resistenz und ermöglichen die Proteinüberexpression in *Escherichia coli*. Über einen lac-Operator wird durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Überexpression induziert. Die entstehenden Proteine sind bei allen Vektoren mit mindestens einem sogenannten *His-Tag* versehen. Hierbei handelt es sich je nach Vektor um sechs bis acht Histidine, die zur Aufreinigung des Proteins dienen. Durch Komplexierung von auf Sepharose immobilisierten Nickelionen durch die Imidazol-Seitenketten der Histidine kann das Protein chromatographisch aufgereinigt werden. Alle verwendeten Plasmide wurden von Merck/Novagen (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

- Der Vektor pET-15b ist 5708bp lang und bedingt neben dem N-terminalen *His-Tag* eine Resistenz gegenüber Ampicillin bzw. Carbenicillin.
- Der Vektor pET-32b ist 5899bp lang und führt neben einem N-terminalen auch zu einem zusätzlichem C-terminalen *His-Tag*. Außerdem wird das Protein mit einem N-terminalen *Trx-Tag* versehen, der die Löslichkeit und Stabilität des Fusionsproteins erhöhen soll [71]. Die vermittelte Resistenz bezieht sich ebenfalls auf Ampicillin bzw. Carbenicillin.
- pET-42b vermittelt Kanamycin-Resistenz. Das überexprimierte Protein trägt neben N- und C-terminalem *His-Tag* den sogenannten *GST-Tag*. Auch hierdurch soll die Löslichkeit erhöht werden.
- Bei Verwendung von pET-43b wird das Protein zusätzlich zu N- und C-terminalem *His-Tag* mit dem *Nus-Tag* exprimiert [72]. Dieses 495 Aminosäuren große Protein soll ebenfalls die Löslichkeit erhöhen. Der Vektor verleiht Ampicillin- bzw. Carbenicillin-Resistenz.

2.5 Bakterienstämme

Name	Hersteller	Eigenschaft
XL 1-Blue	Stratagene, La Jolla, CA, USA	Bakterienstamm zur Plasmidvermehrung
BL21 (DE3)-R3-pRARE2	Dankbar erhalten von Anneke Kramm.	Trägt Plasmid mit Genen von in E. coli selten verwendeten tRNAs [73]
Tuner (DE3) pLys	Merck/Novagen, Darmstadt, Deutschland	Ermöglicht Regulation der Expression über IPTG-Konzentration
Origami (DE3)	Merck/Novagen, Darmstadt, Deutschland	Begünstigt Bildung von Disulfidbrücken
Origami 2 (DE3) pLys	Merck/Novagen, Darmstadt, Deutschland	Begünstigt Bildung von Disulfidbrücken
C41 (DE3)	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland	Toleranz ggü. toxischen Proteinen
C41 (DE3) pLys	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland	Toleranz ggü. toxischen Proteinen
C43 (DE3)	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland	Toleranz ggü. toxischen Proteinen
C43 (DE3) pLys	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland	Toleranz ggü. toxischen Proteinen

Tabelle 3: Liste der verwendeten Bakterienstämme.

2.6 Zelllinien

Bei A431 (Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland) handelt es sich um eine humane epidermoide Karzinom-Zelllinie.

HT-29 ist eine Kolonkarzinom Zelllinie und wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) erhalten.

2.7 Polymerasen

Die verwendeten PCR-Programme für die unterschiedlichen Polymerasen finden sich unter Kapitel 9.1.1 im Anhang.

2.7.1 Phire Hot Start DNA Polymerase

Für PCRs mit qualitativer Fragestellung wurde die Phire Hot Start DNA Polymerase (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) verwendet.

2.7.2 Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase

Die Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) hat aufgrund ihrer Proofreading-Funktion eine deutlich geringere Fehlerrate als gewöhnliche *Taq*-DNA-Polymerasen. Sie wurde deshalb für Anwendungen gewählt, bei denen es besonders darauf ankam, dass die Information der DNA erhalten bleibt.

2.7.3 KAPA2G™ Robust DNA Polymerase

Für die anspruchsvolle Aufgabe der Amplifizierung von bisulfitbehandelter DNA wurde die KAPA2G™ Robust DNA Polymerase (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet.

2.8 Antikörper

In Tabelle 4 sind die für Untersuchungen mittels Western-Blot verwendeten Antikörper aufgelistet.

Bezeichnung / Organismus	Verdünnung	Hersteller
Anti-HIS-HRP / Rabbit	1:10000	MicroMol GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Calnexin (ab75801) / Rabbit	1:5000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-HSD11B1 AB (ab83522) / Rabbit	1:2000	Abcam, Cambridge, UK
NA934VS ECL POS labelled anti rabbit antibody	1:10000	GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA

Tabelle 4: Liste der verwendeten primären Antikörper und des sekundären Antikörpers und die für Western-Blot-Untersuchungen verwendeten Verdünnungen.

2.9 Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs bezogen (Ipswich, MA, USA).

Name	Erkennungssequenz
NdeI	CATATG
BamHI	GGATCC
EcoRI	GAATTC
XhoI	CTCGAG

Tabelle 5: Gezeigt sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Erkennungssequenzen.

2.10 Oligonukleotide/Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen, nach Erhalt mit Wasser auf eine Konzentration von 100 µmol/L eingestellt und bei -20°C gelagert. Wenn nicht anders erwähnt, wurden für PCR-Reaktion Primer mit Konzentrationen von 10 µmol/L eingesetzt. Ein Überblick über die verwendeten Primer findet sich im Anhang in Tabelle 17.

2.11 Geräte

2.11.1 Zentrifugen

Beckman Coulter Optima™ L-90 K Ultracentrifuge (Beckman, Krefeld, Deutschland) für Ultrazentrifugationsschritte (Rotor TFT 70);

Beckman J2-HS (Beckman, Krefeld, Deutschland) zum Zentrifugieren von Bakterienstämmen nach Überexpressionen (Rotor JA-10) und bei der Präparation von Lebermikrosomen (Rotor JA-20);

Heraeus Biofuge-fresco und Heraeus Biofuge-pico (beide Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) zur Zentrifugation von Mikroreagiergefäßen.

2.11.2 Autoklav

System VX-75 (System GmbH, Wetzlar, Deutschland)

2.11.3 SpeedVac

SpeedVac®-Konzentrator PD121P (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

2.11.4 Agarose- und SDS-Geldokumentation

Gel-Jet Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland)

2.11.5 HPLC

Die Komponenten der HPLC-Anlage sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Komponente	Name	Hersteller
Pumpe	Waters 515 HPLC Pump	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
Probengeber	Waters 717plus Autosampler	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
UV-Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
Fluoreszenz-Detektor	RF-10A XL Fluorescence Detector	Shimadzu, Kyoto, Japan
Säule	LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) LiChroCART® 250-4	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 6: Aufgelistet sind die Komponenten der verwendeten HPLC-Anlage.

2.11.6 FPLC-Anlage für die Nickel-Affinitätschromatographie

Äkta-Purifier, 900er-Serie mit HisTrap-HP 1 mL Nickel-Sepharose-Säule (beide GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA)

2.11.7 pH-Meter

pH535 MultiCal® (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland)

2.11.8 PCR-Cycler

T-Gradient und T-Professional (beide Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)

2.11.9 Real-Time Cycler

7500 Fast Real-Time-PCR System und ABI Prism 7900HT Sequence Detector (beide Life Technologies/Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)

2.11.10 Dispergiergerät

Ultra-Turrax T25 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)

2.11.11 Zell-Homogenisator

Zell-Homogenisator (Colora Messtechnik GmbH, Lorch, Deutschland)

2.11.12 Photometer

- Gene Quant II (GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA)
- Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Uvikon® 810 (Kontron Analytical GmbH, Schweiz)
- Cary 100 Scan Photometer (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Tecan GENios Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz)

2.11.13 Ultraschallhorn

Sonopuls UW2200 Ultraschallstab (Bandelin, Berlin, Deutschland)

2.11.14 French Press

French Pressure Cell Press (Polytec, Waldbronn, Deutschland)

2.11.15 Pyrosequenziergerät

PSQ HS 96 (Qiagen, Hilden, Deutschland)

3 Zellkultur⁹

3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden im Zellkultur-Inkubator bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ in Luft und einer relativen Luftfeuchte von 95% kultiviert.

Die Zelllinie A431 wurde in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (30 min bei 56°C) und 4 mM L-Glutamin kultiviert. Die Kultivierung der Zelllinie HT-29 erfolgte in DMEM mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin und 1% (v/v) NEAA (*engl.: non essential amino acids*).

Bei den Erhaltungskulturen wurde je nach Zelllinie das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte nach Standardbedingungen unter Verwendung von Trypsin-EDTA-Lösung (0,2% (v/v) Trypsin), wobei die HT-29 Zellen im Verhältnis 1:5 und die A431 Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet wurden. Für die Behandlung mit 5-Azacytidin wurden dem Medium jeweils entsprechende Mengen einer 2,5 mM- bzw. 5,0 mM-Stock-Lösung von 5-Azacytidin in sterilem Wasser beigemischt.

3.2 Genexpressionsstudie: Behandlung mit 5-Azacytidin (5 µM) für 72 h

Aufgrund der Tatsache, dass sich das 5-Azacytidin nur während der Replikation in die DNA einbaut, sollte die gewählte Aussaat-Dichte gewährleisten, dass sich die Zellen über den gesamten Behandlungszeitraum noch teilen können.

Da die beiden verwendeten Zelllinien HT-29 und A431 unterschiedliche Verdopplungszeiten haben, wurde zunächst ein Test-Ansatz mit behandelten und unbehandelten Kontroll-Zellen durchgeführt, um die optimale Aussaat-Dichte zu bestimmen. Für die HT-29 Zellen wurde eine geeignete Aussaat-

⁹ Die Durchführung erfolgte durch Frau Dr. Bettina Ebert.

Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Well ($9,6 \text{ cm}^2$) einer 6-Well-Platte bestimmt. Für die schneller wachsenden A431 Zellen konnte eine Proliferation über 72 h bei einer Ausgangs-Dichte von $2,2 \times 10^5$ Zellen pro Well gewährleistet werden.

Die Inkubationsversuche beider Zelllinien mit einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ 5-Azacytidin im Medium erfolgte in 6-Well-Platten, wobei je Erntezeitpunkt (24 h, 48 h und 72 h) eine Platte verwendet wurde und sich auf jeder Platte jeweils drei behandelte Ansätze und drei Kontrollen befanden ($n = 3$).

Die Zellen wurden zunächst in einer Zellkulturflasche (75 cm^2) herangezogen (A431: 100% Konfluenz; HT-29: 90% Konfluenz), trypsinisiert und in jeweils 10 mL Medium aufgenommen. In einem Aliquot der jeweiligen Zell-Suspension wurde mittels Thoma-Kammer die Zellzahl bestimmt.

Für die A431 Zellen (Passage +24) wurde pro 6-Well-Platte 1 mL dieser Zellsuspension mit 24 mL Medium verdünnt und je 2 mL dieser verdünnten Zellsuspension in jedes Well ($9,6 \text{ cm}^2$) gegeben, in das bereits 2 mL Kulturmedium vorgelegt waren. So ergab sich ein Arbeitsvolumen von 4 mL und eine Aussaat-Dichte von $2,2 \times 10^5$ Zellen pro Well für die A431 Zellen. Die langsamer wachsenden HT-29 Zellen (Passage +29) wurden in ähnlicher Weise ausgesät, wobei von den ursprünglichen 10 mL Zell-Suspension (s. o.) 2 mL mit 23 mL Medium verdünnt wurden. Durch die Verwendung von 2 mL dieser verdünnten Zellsuspension pro Well wurde eine Aussaat-Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Well erreicht, wobei das Behandlungsvolumen ebenfalls 4 mL betrug.

Für die Behandlung mit 5-Azacytidin wurden $4 \mu\text{L}$ einer 5 mM -Lösung direkt ins Wells pipettiert und durch kreisende Bewegung vermischt. Durch die Verdünnung um den Faktor 1 000 ergab sich die gewünschte Konzentration von $5 \mu\text{M}$ 5-Azacytidin im Medium der behandelten Zellen. Medium und 5-Azacytidin wurden nach 24 h und 48 h erneuert. Die Ernte der Zellen für die RNA-Gewinnung erfolgte wie in 4.6.1 beschrieben.

3.3 Langzeitbehandlung mit 5-Azacytidin (2,5 μ M) und Effekte auf Proteinexpression und Methylierungsmuster

Für die Untersuchung der Effekte von 5-Azacytidin auf das Methylierungsmuster der genomischen DNA und die Proteinexpression des *HSD11B1*-Gens mittels Western-Blot wurde eine Langzeitbehandlung von Zellen in 25 cm²-Flaschen durchgeführt. Die behandelten Zellen (n = 2) wurden kontinuierlich in Kulturmedium gehalten, welches 2,5 μ M 5-Azacytidin enthielt und vor Erreichen des konfluenten Zustands subkultiviert. Parallel dazu wurden unbehandelte Zellen (n = 2) kultiviert und jeweils zur gleichen Zeit gesplittet. Zur Behandlung wurde eine Stock-Lösung von 2,5 mM 5-Azacytidin (gelöst in sterilem Wasser) eingesetzt. Durch die 1 000-fache Verdünnung mit Zellkulturmedium (z. B. 6 μ l 5-Azacytidin auf 6 ml Medium) ergab sich die Endkonzentration von 2,5 μ M im Behandlungsmedium. Zum Ende des Versuchs wurden die Zellen in größere Kulturgefäße ausgesät, um genug Material zur Isolation von genomischer DNA und Protein zu erhalten (HT-29 1 x 148 cm², 1 x 56 cm², 1 x 21 cm², A431 gesplittet auf 1 x 148 cm² und 2 x 56 cm²).

Proben zur Gewinnung von genomischer DNA wurden trypsinisiert, in 1 mL Cryo-Medium (70% DMEM, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Aufbewahrung in Cryo-Medium sollte eine eventuelle Schädigung der DNA durch den Einfrierprozess verhindern. Proben für die Isolierung von Protein wurden ebenfalls trypsinisiert, zur Entfernung von Trypsin-Resten zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

HT-29 Zellen wurden für 13 Tage (4 Passagen) mit 2,5 μ M 5-Azacytidin behandelt, wobei das 5-Azacytidin täglich neu dazu gegeben wurde. Die letzte Ernte erfolgte nach 72 h Behandlung. A431 Zellen wurden für 11 Tage (4 Passagen) mit 2,5 μ l 5-Azacytidin behandelt, wobei das 5-Azacytidin täglich neu dazu gegeben wurde. Die letzte Ernte erfolgte nach 48 h Behandlung.

4 Methoden der Molekularbiologie

4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung von DNA dient dem Experimentator in vielerlei Weise und ist als Werkzeug im heutigen Labor unabdingbar. In dieser Arbeit wurde das Verfahren der PCR verwendet, um spezifische DNA-Abschnitte qualitativ (siehe 4.8.7 Kolonie-PCR), semiquantitativ und quantitativ (siehe 4.7 Quantitative Real-Time-RT-PCR) nachzuweisen bzw. für eine weiterführende Anwendung zu vervielfältigen (siehe 4.5 Pyrosequenzierung, 4.8.2 Schnittstellen-PCR).

Eine Übersicht der verwendeten PCR-Programme befindet sich im Anhang unter 9.1.

4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Herstellung von Agarose-Gelen wurden 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer bis zur Schlierenfreiheit aufgekocht und 0,01% (v/v) Gel-Red™ Nucleic Acid Gel Stain als DNA-Farbstoff zugegeben. Die Lösung wurde dann in entsprechende Formen gegossen und die DNA-Proben mit 6x DNA Loading Dye versetzt. Im Anschluss wurden die Proben und eine passende DNA-Leiter auf das erstarrte Gel geladen und die Elektrophorese je nach Größe des Gels bei 80-120 mA durchgeführt.

4.3 Gewinnung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden die bei -80°C gelagerten Zellen nach dem Auftauen abzentrifugiert (4 min, 4500 Upm), zweimal mit 750 µL PBS gewaschen und in 200 µL PBS resuspendiert. Die anschließende Aufarbeitung mit Hilfe des *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) erfolgte laut Anleitung des Herstellers. Die Konzentration der isolierten genomischen DNA wurde mit Hilfe des Qubit® 2.0 Fluorometer bestimmt.

4.4 Bisulfitbehandlung von genomischer DNA

Die DNA-Methylierung gehört zu den epigenetischen Modifikationen. In der menschlichen DNA sind Cytosine nur in sogenannten Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (kurz CpGs) methyliert. Anhäufungen solcher CpGs im Promotorbereich dienen als Regulator zahlreicher Gene und heißen CpG-Inseln.

Definiert sind CpG-Inseln als DNA-Abschnitte von mindestens 200 bp Länge, bei einem GC-Gehalt von mindestens 50% und einem Verhältnis von tatsächlichen CpGs zu den zu erwartenden CpGs (anhand der Menge von Cytosinen und Guaninen im entsprechenden DNA-Abschnitt) von mindestens 0,6 [74]. Der Methylierungsgrad der Cytosine kann hier beeinflussen wie stark ein Gen abgelesen wird. Es ist somit von großem Interesse, ob bzw. inwiefern sich der Methylierungsgrad durch Einflüsse und Stimuli verändert.

Zur Unterscheidung von methylierten und nicht-methylierten Cytosinen hat sich die nach Frommer *et al.* entwickelte Methode der Bisulfitbehandlung und anschließender Sequenzierung bewährt [75;76]. Unmethyliertes Cytosin erfährt unter Behandlung mit Bisulfit (Hydrogensulfit) eine Desaminierung (siehe Abb. 4.1).

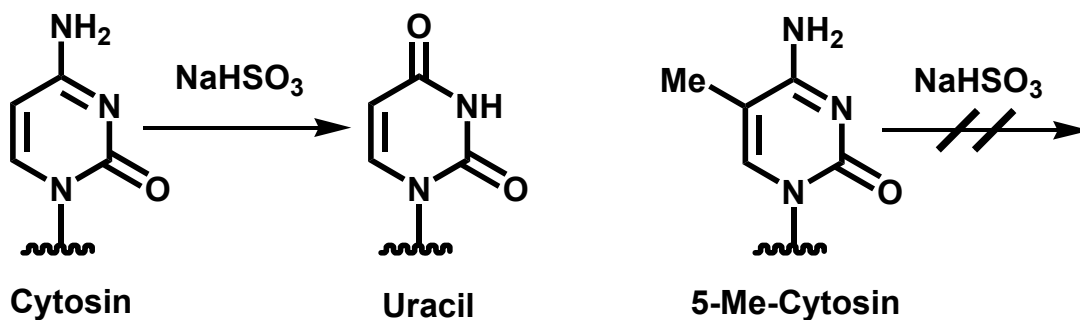


Abb. 4.1: Desaminierung von Cytosin durch die Behandlung von Bisulfit. 5-Methyl-Cytosin wird durch die Behandlung nicht desaminiert.

Es entsteht Uracil, welches in einer folgenden PCR als Thymin vermehrt wird. Methyliertes Cytosin hingegen bleibt während der Behandlung unverändert. Somit entsteht ein in der Sequenzierung erkennbarer Unterschied in der Basenabfolge. Für die Bisulfitbehandlung von

genomischer DNA zur Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen wurde das *EpiTect Fast Bisulfite Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

4.5 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung unterscheidet sich als Methode von der herkömmlichen Sanger-Sequenzierung. Die Desoxynukleotide (dNTPs) werden jeweils einzeln nacheinander zugegeben und vor Zugabe des nächsten wieder zerstört. Bei Zugabe des richtigen dNTPs erzeugt ein Enzymsystem aus dem beim Einbau freiwerdenden Pyrophosphat ein Lichtsignal, das proportional zur Menge ist.

Der Vorteil der Pyrosequenzierung gegenüber der Sanger-Sequenzierung ist somit, dass sie neben der Detektion auch die Quantifizierung von unterschiedlichen Basen an einer Position einer gegebenen Sequenz ermöglicht. Man kann somit in der Folge sagen, in welchem Verhältnis zwei Basen an einer Position innerhalb der Sequenz zueinander stehen. Das Verfahren findet deshalb u. a. Anwendung in der Ermittlung der Ausprägung von sogenannten SNPs (*engl. Single Nucleotide Polymorphism*).

Im Zuge dieser Arbeit wurden durch die vorangegangene Bisulfitbehandlung alle nicht-methylierten Cytosine von genomischer DNA in Uracil umgewandelt. Der zu sequenzierende Bereich wurde dann aus der bisulfitbehandelten DNA durch eine PCR herausamplifiziert. Verwendet wurde hierfür die KAPA2G™ Robust DNA Polymerase (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Das entsprechende Programm findet sich im Anhang unter 9.1.1. Während dieser PCR wurde die entstandene RNA-Base Uracil als ihre korrespondierende DNA-Base Thymin vervielfacht. Die entstandene Sequenz unterscheidet sich somit von der ursprünglichen dadurch, dass alle Cytosine, die nicht Bestandteil eines CpG-Dinukleotid sind und als solche nicht methyliert vorliegen, durch Thymin ausgetauscht wurden. Die Cytosine in CpG-Dinukleotiden wiederum können methyliert sein, müssen aber nicht. Somit kann in der entstandenen Sequenz an der Position eines CpG-Cytosins entweder ein Thymin entstanden sein oder nach wie vor oder das Cytosin geblieben sein. Mit Hilfe der Pyrosequenzierung lässt sich bestimmen zu wie viel Prozent das untersuchte

CpG-Dinukleotiden methyliert ist. Die Pyrosequenzierung erfolgte mit dem PSQ HS 96 (Qiagen, Hilden, Deutschland).

4.6 cDNA-Gewinnung

4.6.1 cDNA aus Zellen

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels *MasterPure™ RNA Purification Kit* (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). Hierfür wurden 600 µL *Tissue-and-Cell-Lysis-Solution* mit 2 µL Proteinase K (50 µg/µL) zu den Zellen in die Petrischale gegeben. Nach 1 min Schwenken wurde die Suspension entnommen und direkt laut Anleitung des Herstellers aufgearbeitet oder bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe von Messungen mit dem Gene Quant II oder dem Qubit® 2.0 Fluorometer bestimmt.

Die reverse Transkription erfolgte mittels *RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific/Fermentas, Waltham, MA, USA) laut Anleitung des Herstellers unter Verwendung von Random-Primern. Je nach Konzentration der isolierten RNA wurden 1-2 µg in die Reaktion eingesetzt.

4.6.2 cDNA aus Lungengewebe

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels *MasterPure™ RNA Purification Kit* (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). 10-20 mg Gewebe wurden in 600 µL *Tissue-and-Cell-Lysis-Solution* mit 2 µL Proteinase K (50 µg/µL) mittels eines Dispergiergeräts homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte laut Anleitung des Herstellers. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem Gene Quant II bestimmt. Die reverse Transkription erfolgte mittels *RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific/Fermentas, Waltham, MA, USA) laut Anleitung des Herstellers unter Verwendung von Random-Primern. Es wurden 2 µg RNA in die Reaktion eingesetzt.

4.6.3 cDNA aus Darmgewebe^r

Für die Schritte der RNA-Isolierung und der reversen Transkription wurden das *RNeasy Kit* sowie das *Omniscript RT Kit* verwendet (beide Qiagen, Hilden, Deutschland).

4.7 Quantitative Real-Time-RT-PCR

Für die Quantifizierung mittels Real-Time-RT-PCR gibt es zwei unterschiedliche Methoden [77;78]. Die relative Quantifizierung gibt das Ergebnis relativ zu einem Kalibrator bzw. internen Kontrollgen an. Die absolute Quantifizierung wiederum berechnet die absolute Kopienzahl des Zielgens unter Zuhilfenahme einer Standardkurve.

4.7.1 Relative Quantifizierung

Die für die relative Quantifizierung verwendeten Real-Time-PCR-Assays sind in Tabelle 7 aufgeführt. Alle Assays wurden von Life Technologies/Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) bezogen. Als Kontrollgen diente in allen Fällen β -Aktin. Die verwendeten Temperaturprogramme sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 16).

Zielgen	Assay-Nummer
11 β -HSD 1	Hs01547870_m1
11 β -HSD 2	Hs00388669_m1
β -Aktin (ACTB)	Hs99999903_m1
NR3C1 (GR)	Hs00353740_m1

Tabelle 7: Gezeigt sind die für die relative Quantifizierung verwendeten Real-Time-PCR-Assays und ihre Bezeichnungen (alle Life Technologies/Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

^r Die Aufarbeitung der Proben erfolgte im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

4.7.1.1 Relative Quantifizierung in Proben von Patienten mit CED^s

Für die Untersuchung der Proben von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und den Kontrollen wurden die Assays für 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2 verwendet (siehe Tabelle 7). Die Messungen erfolgten mit dem ABI 7900HT Sequence Detection System.

4.7.1.2 Relative Quantifizierung in Zellproben nach Behandlung mit 5-Azacytidin

Die cDNA der mit 5-Azacytidin behandelten Zellen wurde auf die Transkriptlevel der Gene von 11 β -HSD Typ 1 und 2 sowie NR3C1 (Glucocorticoid-Rezeptor) untersucht. Die verwendeten Real-Time-PCR-Assays sind in Tabelle 7 aufgeführt. Es wurden 50-100 ng cDNA pro Well eingesetzt. Für die Messungen der 20 μ L-Ansätze auf dem 7500 Fast Real Time PCR System wurde der TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix verwendet (beide Life Technologies/Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

4.7.2 Absolute Quantifizierung

4.7.2.1 Design von Real-Time-PCR-Sonden zur Quantifizierung der Transkriptvarianten der 11 β -HSD 1

Für die Quantifizierung der Transkriptvarianten P1 (entsprechend Transkriptvariante 2 in der *GenBank*®-Datenbank, NM_181755) und P2 (entsprechend Transkriptvariante 1 in der *GenBank*®-Datenbank, NM_005525) der 11 β -HSD 1 wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Real-Time-PCR-Sonden designt und von Life Technologies/Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) bezogen.

^s Die Messungen der Proben erfolgten im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Bezeichnung	Sequenz
Sonde P1	VIC-TCAGATTTGTTTCGAAATC-MGB
Sonde P2	6-FAM-TTCTCTCTGTGTGTCCTAC-MGB

Tabelle 8: Verwendete Real-Time-PCR-Sonden für die Transkripte P1 und P2 der 11 β -HSD 1.

Die Fluoreszenzfarbstoffe VIC und 6-FAM sollten mit ihren unterschiedlichen Emissionswellenlängen (Sonde P1: VIC, Emissionswellenlänge 554 nm; Sonde P2: 6-FAM, Emissionswellenlänge 518 nm) einen Duplex-Ansatz, also die Verwendung beider Assays parallel in einem Ansatz, ermöglichen.

4.7.2.2 Bestimmung der Spezifität und der Effizienz der designten Real-Time-PCR-Sonden

Zur Überprüfung der Spezifität und Effizienz der Sonden wurden Messungen mit Ansätzen bekannter Transkriptzahlen durchgeführt. Hierfür wurden die EST-Klone BG619051 (Promotor 1, IMAGE: 4730372) und BC012593.1 (Promotor 2, IMAGE: 4286028; beide Source BioScience, Nottingham, UK) käuflich erworben. In beiden Fällen waren die Zielsequenzen in den Vektor pDNR-LIB kloniert. Die Plasmide wurden in transfizierten *E. coli*-Zellen in Agar-Röhrchen geliefert. Mit einer sterilen Impföse wurde analog zu Kapitel 5.3.1 eine Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Vervielfältigung wurden die Plasmide isoliert (Kapitel 4.8.1.3) und photometrisch vermessen. Laut Angabe des Herstellers wurde für das Klonieren das Restriktionsenzym *Sfi*I verwendet. Der ursprüngliche Vektor pDNR-LIB ist 4160 bp groß. Durch den Verdau mit *Sfi*I, für das es zwei Schnittstellen im Vektor gibt, wurde ein 216 bp großes Fragment herausgeschnitten. Es ergaben sich somit nach Einbringen des jeweiligen Inserts Vektoren der Größen 4548bp (Promotor 1, Insertgröße 604bp + 3944bp Vektor nach Verdau) und 5292bp (Promotor 2, Insertgröße 1348bp + 3944bp Vektor nach Verdau). Anhand der photometrisch bestimmten Konzentration und der bekannten Molekulargewichte der Plasmide, konnte eine absolute Transkriptzahl einer Lösung berechnet werden.

Es wurden Lösungen mit 10^2 bis 10^7 Transkripten/ μ L beider Plasmide angesetzt und unter Verwendung der Real-Time-PCR-Sonden mit den Primern #117/118 (für P1) und #218/118 (für P2) vermessen. Eine Übersicht

über die Komponenten und deren Volumina pro Ansatz findet sich in Tabelle 9.

Komponente	Volumen
TaqMan Gene Expression Master Mix	15 µL
5'-Primer #117 (10 µM)	2,7 µL
5'-Primer #218 (10 µM)	2,7 µL
3'-Primer #118 (10 µM)	5,4 µL
Sonde P1 (10 µM)	0,6 µL
Sonde P2 (10 µM)	0,6 µL
H ₂ O	2 µL
cDNA	1 µL

Tabelle 9: Reaktionsansatz zur Bestimmung der Spezifität und der Effizienz der designierten Real-Time-PCR-Sonden für die Quantifizierung der Transkriptvarianten P1 und P2 der 11β-HSD 1.

Die Primerkonzentrationen in den 30 µL-Ansätzen betragen 0,9 µM, die der Sonden 0,2 µM. Die Messungen erfolgten mit dem ABI Prism 7900HT Sequence Detector unter Verwendung des TaqMan® Gene Expression Master Mix (beide Life Technologies/Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Das entsprechende Temperaturprogramm ist im Anhang aufgeführt (Tabelle 16).

4.8 Klonierung

4.8.1 DNA-Reinigung

4.8.1.1 DNA-Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland).

4.8.1.2 DNA-Reinigung von Restriktionsansätzen

Zur Reinigung von Restriktionsansätzen wurde das *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

4.8.1.3 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen nach Transformation erfolgte mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland), laut Anleitung des Herstellers. Für die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das *Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Die kommerziell erworbenen Plasmide zur Quantifizierung der Transkriptvarianten von 11 β -HSD 1 wurden unter Verwendung des *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega Fitchburg, WI, USA) gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert.

4.8.2 Schnittstellen-PCR

Als initialer Schritt wurden unterschiedliche Templates (cDNA, Plasmid) in eine PCR eingesetzt. Verwendet wurde hier die Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten waren entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Ein typisches Temperaturprogramm befindet sich im Anhang (Tabelle 15). Das entstandene Amplikon wurde gereinigt und im Restriktionsverdau eingesetzt.

Die verwendeten Oligonukleotide bestanden neben einer dem Template komplementären Sequenz zusätzlich aus einem Anhang, der einer Schnittstelle eines Restriktionsenzym entspricht und einem Überhang, der ein effizientes Ansetzen der Restriktionsenzyme ermöglichen sollte.

Bei den 5'-Primern #226 und #304, die für die Klonierung in die Vektoren pET-32b, pET-42b und pET-43b verwendet wurden, wurde zwischen der für das Restriktionsenzym *EcoRI* spezifischen Sequenz und der Templatesequenz ein Guanin eingeführt (siehe Tabelle 17, als Großbuchstabe hervorgehoben), um einen ansonsten auftretenden Frameshift zu verhindern.

4.8.3 Restriktionsverdau

Restriktionsansätze wurden üblicherweise für 1-2 h bei 37°C in Heizblöcken inkubiert. Je nach Art und Anforderung der verwendeten

Restriktionsendonukleasen wurde dem Reaktionsansatz BSA zugegeben und ein entsprechender Puffer gewählt. Für die Klonierung in den Vektor pET-15b wurden die Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI*, für die Klonierung in die Vektoren pET-32b, pET-42b und pET-43b die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* verwendet.

Nach Abschluss der Reaktion wurde die aufgereinigte DNA in einem Ligationsansatz eingesetzt.

4.8.4 Ligation

Ligationen wurden mit dem *Rapid DNA Dephos & Ligation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) laut Anleitung des Herstellers durchgeführt.

4.8.5 Mutagenese

Die Mutation im Insert des kommerziell bezogenen Klons für Transkript B der 11 β -HSD 3 (LIFESEQ90220519, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wurde mittels *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) nach Ligation in pET-32b wieder rückgängig gemacht. Die Durchführung erfolgte laut Anleitung des Herstellers. Es wurden die Primer #341 und #342 verwendet (siehe Tabelle 17).

4.8.6 Transformation

4.8.6.1 Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte mit Hilfe der Rubidiumchlorid-Methode [79]. Hierfür wurde mit einer sterilen Pipettenspitze über die bei -80°C gefrorene Zelloberfläche gestrichen und hiermit etwa 5 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C über Nacht wachsen gelassen, um mit ihr am folgenden Tag eine Kultur von 200 mL mit entsprechendem Antibiotikum anzupflanzen. Diese Kultur wurde bis zu einer OD_{600nm} von etwa 0,5 AU wachsen gelassen, um im Anschluss bei 4°C 15 min bei 6 000 g zentrifugiert zu werden. Das Pellet wurde in 75 mL TFB I-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und erneut

zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 mL TFB II-Puffer resuspendiert. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.8.6.2 Transformation von Bakterien mit einem Ligationsansatz

Für die Transformation nach einer Ligation wurde der gesamte Ligationsansatz zu 50 µL kompetenten Zellen in einem Mikroreagiergefäß gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s im Heizblock. Die Proben wurden danach sofort wieder auf Eis gestellt und nach 2 min mit 500 µL LB-Medium versetzt. Nach 1 h bei 37°C wurde 4 min bei 4500 Upm zentrifugiert. Es wurden 500 µL Medium abgenommen, das Pellet im verbleibenden Medium resuspendiert und 50 µL hiervon auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden einzelne KBE mit einer sterilen Pipettenspitze ausgestochen, um Vorkulturen von 4 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum anzupflanzen.

4.8.6.3 Transformation von Bakterien mit gereinigtem Plasmid

Für die Transformation mit gereinigtem Plasmid wurde 1 µL einer Plasmidlösung zu 50 µL kompetenten Zellen gegeben und nach 30 min auf Eis analog zu Kapitel 4.8.6.2 mit dem Hitzeschock weiterbehandelt.

4.8.7 Kolonie-PCR

Der Erfolg einer Transformation wurde bei Bedarf mittels Kolonie-PCR überprüft. Hierfür wurde 1 µL einer mindestens fünf Stunden alten Vorkultur als Template eingesetzt. Verwendet wurde hierfür die Phire Hot Start DNA Polymerase (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland). Das verwendete Temperaturprogramm findet sich in Tabelle 15 im Anhang. Die Auftrennung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 4.2).

4.8.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung isolierter Plasmide erfolgte durch die Firma SeqLab-Sequence Laboratories (Göttingen, Deutschland) oder im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Die für die Sequenzierungen verwendeten Primersequenzen finden im Anhang in Tabelle 17.

Bei Plasmidkonzentrationen von deutlich unter 100 ng/μL erfolgte vor der Sequenzierung eine Vervielfältigung der DNA mit Hilfe des *TempliPhi Amplification Kit* (GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA) nach Anleitung des Herstellers.

5 Methoden der Proteinbiochemie

5.1 Präparation von Lebermikrosomen

Das Lebergewebe (5-6 g) wurde in 10 mL kaltem Homogenisierungspuffer mit 1 mM PMSF zerschnitten. Unter Eiskühlung wurde die Probe im Zell-Homogenisator homogenisiert. Anschließend wurde mit weiteren 15 mL gekühltem Puffer versetzt und für 30 min bei 4°C bei steigenden g-Zahlen zentrifugiert (Beckman J2-HS, 10 min 650 g, 10 min 6500 g, 10 min 10 000 g).

Der Überstand wurde abdekantiert und 60 min bei 100 000 g und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (Rotor TFT 70). Das Pellet wurde in 4 mL 150 mM KCl resuspendiert und erneut für 45 min bei 100 000 g zentrifugiert. Dieses Pellet wurde in 3 mL Homogenisierungspuffer ohne PMSF resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2 Aktivitätsbestimmung von 11 β -HSD 1 in Mikrosomen

Zur Überprüfung der Aktivität wurden 5 μ L Mikrosomen zum Ansatz aus 10 μ L regenerierendem System, 10 μ L frisch angesetzter 5 mM Metyrapon-Lösung und 25 μ L 0,1 M NaH₂PO₄-Puffer pH 7,4 gegeben. Es wurde 30 min bei 37°C inkubiert, mit 150 μ L Acetonitril versetzt, gemischt (Vortex) und anschließend 5 min bei 16 000 g zentrifugiert. Vom Ansatz wurden 20 μ L auf die HPLC aufgetragen und entstandenes Metyrapol durch UV-Messung detektiert (siehe 5.8.1.2).

5.3 Überexpression und Proteinreinigung

5.3.1 Vorkultur

Für Vorkulturen aus Glycerolstocks wurden 20 mL LB-Medium mit 20 μ L entsprechendem Antibiotikum und 5 μ L Glycerolstock versetzt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Für Vorkulturen im Anschluss an eine Transformation wurde eine KBE mit einer sterilen Pipettenspitze ausgestochen und zu 5 mL LB-Medium mit 5 µL Antibiotikum gegeben. Es wurde auch hier über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.3.2 Überexpression

Sofern nicht anders erwähnt wurden 50-400 mL Antibiotika-enhaltendes Medium mit einer Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,7 AU wachsen gelassen und dann mit IPTG induziert, dessen Endkonzentrationen zwischen 0,3 und 1 mM variiert wurde. Nach 3 h wurde die Kultur bei 4°C für 15 min bei 6 000 g zentrifugiert und das Zellsediment bis zum Zellaufschluss bei -20°C tiefgefroren.

5.3.3 Bakterien-Zellaufschluss

5.3.3.1 Bakterien-Zellaufschluss mittels Ultraschall

Zellpellets der Überexpression wurden in 5-10 mL Imidazol-Puffer A resuspendiert, mit 1 mg Lysozym versetzt und 30 min im Eisbad geschüttelt. Der Aufschluss erfolgte unter Eiskühlung mittels Behandlung mit Ultraschall mit 200 W für 10 s gefolgt von 50 s Ruhephase mit weiterer Eiskühlung. Der Vorgang wurde sechsmal wiederholt. Im Anschluss wurde zweimal bei 4°C für 45 min bei 12 000 g zentrifugiert und der Überstand mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt.

5.3.3.2 Bakterien-Zellaufschluss mit einer French Press

Für den Aufschluss mittels French Pressure Cell Press wurden Zellpellets in 10-20 mL Imidazol-Puffer A resuspendiert und in den Kolben gefüllt. Der zugehörige Stempel wurde mit einem Druck von 2 000 psi (~138 bar) in den Kolben gedrückt und die erhaltene Suspension unter Eiskühlung aufgefangen. Im Anschluss wurde bei 4°C zweimal für 45 min bei 12 000 g oder einmal für 1 h bei 100 000 g zentrifugiert und der Überstand mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt.

5.3.4 Proteinreinigung / Nickel-Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung der rekombinant hergestellten Proteine wurden 1 mL-HisTrap-HP-Säulen in einer FPLC-Anlage (Äkta-Purifier, 900er-Serie, GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA) verwendet. Die Säule wurde zunächst mit Imidazol-Puffer B gespült, um eventuelle Reste vorangegangener Reinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule mit Imidazol-Puffer A äquilibriert. Beide Schritte erfolgten bis zur Konstanz der Leitfähigkeit. Nach Umstellen auf Puffer A wurde der Überstand mit einer Flussrate von 0,5 mL/min aufgetragen. Nachdem die Absorption bei 280 nm durch nicht-bindende Proteine wieder auf den Anfangswert gesunken war, wurde die Flussrate auf 1 mL/min erhöht und der Anteil an Imidazol-Puffer B kontinuierlich gesteigert, um mit dem simultan steigenden Imidazol-Gehalt die komplexierten Proteine zu eluieren. Verwendet wurde ein Gradient bei dem innerhalb von 30 min auf Imidazol-Puffer B umgestellt wurde. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese auf ihren Proteingehalt untersucht.

5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde üblicherweise mit dem Verfahren nach Bradford bestimmt [80]. Hierfür wurde zunächst eine Kalibrationsgerade mit Lösungen von BSA bekannter Konzentration (von 0,1-1,4 mg/mL BSA in Wasser bzw. entsprechendem Puffer) aufgenommen. 5 µL der Lösungen wurden zu 250 µL Bradford-Reagenz in einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und mindestens 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei 595 nm mit Hilfe des Tecan GENios Pro gemessen. Analog wurden Blindwerte mit Wasser bzw. entsprechendem Puffer bestimmt und die Proben vermessen. Anhand der ermittelten Standardkurve konnte die Konzentration der Proteinlösungen bestimmt werden.

Die Proteinbestimmung der mit 5-Azacytidin behandelten Zellproben und ihrer Kontrollen erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Merck/Novagen, Darmstadt, Deutschland) laut Angaben des Herstellers. Es wurden analoge BSA-Lösungen verwendet wie bei der Bestimmung nach Bradford (s. o.).

5.5 SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel Elektrophorese) wurde das *Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System* mit *NuPage® 10% Bis-Tris Gelen* mit 10 oder 15 Taschen (Life Technologies/ Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die Probenvorbereitung und Durchführung unter reduzierenden Bedingungen und Verwendung von MES-Puffer erfolgte laut Angaben des Herstellers.

Im Anschluss wurden die SDS-Gele entweder mit Coomassie-Färbelösung für mindestens 2 h gefärbt, um dann mit 10% Essigsäure wieder entfärbt zu werden, oder für einen folgenden Western-Blot verwendet.

5.5.1 SDS-Gelelektrophorese nach Überexpression

Die SDS-Gelelektrophorese wurde auch verwendet, um den Erfolg einer Überexpression zu dokumentieren. Während der Überexpression wurden dafür unmittelbar vor Induktion mit IPTG und am Ende der Inkubationszeit Proben entnommen. Hierfür wurden 200 µL der Probe vor Induktion und 100 µL der Probe vom Ende der Überexpression 4 min bei 4500 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10-20 µL der gleichen Probe resuspendiert und zum Zellaufschluss 5 min bei 95°C inkubiert. Die folgende Aufarbeitung erfolgte laut Angaben des Herstellers.

Zur Beantwortung der Frage der Löslichkeit des Zielproteins wurden nach Zellaufschluss auch Proben der löslichen sowie der unlöslichen Fraktion aufgetragen. Die lösliche Fraktion in Imidazol-Puffer A wurde unverdünnt laut Angaben des Herstellers eingesetzt und aufgearbeitet. Das beim Zellaufschluss nach Zentrifugation entstandene Pellet wurde mit 5-10 mL Imidazol-Puffer A mit 6 M Harnstoff angelöst und ein entsprechendes Volumen ebenfalls unverdünnt eingesetzt (s.o.).

5.5.2 SDS-Gelelektrophorese Zellversuche

Die pelletierten Zellen (siehe 3.3) wurden in 100-300 µL RIPA-Puffer gelöst und im Anschluss eine Proteinbestimmung mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Merck/Novagen, Darmstadt, Deutschland) laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 50-75 µg Protein laut

Angaben des Herstellers eingesetzt und aufgearbeitet. Als Positivkontrollen dienten Lebermikrosomen und Cytosol vom Fettgewebe (beides Schwein).

5.6 Western-Blot

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel mit Hilfe des XCell II Blot Module (Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) laut Angaben des Herstellers auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran mit 5% Milchpulver in PBS-T für 90 min bei RT oder über Nacht bei 4°C geblockt. Im Anschluss wurde primärer Antikörper zugegeben und 90 min bei RT oder über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach Spülen und dreimaligen Waschen in PBS-T-Puffer für je 10 min wurde der sekundäre Antikörper zugegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Spülen und Waschen wurde die Membran für 3 min in ECL® Detektionsreagenz (GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA) gegeben. Anschließend erfolgte die Belichtung eines Films (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA) in einer Fotokassette. Der belichtete Film wurde danach für 1 min entwickelt und 3-5 min fixiert (LX24 Entwickler und AL4 Fixierer, beide Kodak, Rochester, NY, USA; beide 1:5 verdünnt). Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper findet sich unter 2.8.

Für die Detektion des Referenzproteins wurde die Membran zweimal für mindestens 40 min in Stripping-Puffer bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran gewaschen (s. o.), 5 s in Methanol reaktiviert, erneut gewaschen und dann das bereits beschriebene Verfahren ab dem Schritt des Blockens wiederholt.

5.7 Thrombinverdau

Zur Abspaltung des *Nus-Tags* nach Überexpression in pET-43b wurden unterschiedliche Konstrukte mit Thrombin über Nacht bei RT verdaut. Volumina bis 2 mL wurden zunächst unter Zuhilfenahme von einer Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin 500, MWCO 10 000; Sartorius, Göttingen, Deutschland) auf PBS-Puffer umgepuffert und aufkonzentriert. Größere Volumina wurden direkt nach der Aufreinigung verdaut und im Anschluss

umgepuffert (Amicon Ultra-15; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Laut Angaben des Herstellers reichen 10 units des Enzyms, um 1 mg Protein über Nacht zu verdauen. Für Volumina bis 50 µL wurde Thrombin in Konzentrationen von 1 unit pro 15-25 µg Protein eingesetzt. Für Volumina bis 20 mL wurde die Konzentration zehnfach verringert.

5.8 Substratuntersuchungen

Für die Detektion von Cortisol, Cortison, Metyrapon und Oracin konnten bereits etablierte Untersuchungsmethoden unter Verwendung von HPLC genutzt werden [34;40;81]. Für alle anderen Substanzen erfolgte die Detektion indirekt als Abnahme der NAD(P)H-Konzentration mit Hilfe des Cary 100 Scan Photometer bzw. des Tecan GENios Pro. Eine Auflistung der Substanzen findet sich im Anhang in Tabelle 18.

5.8.1 Substratuntersuchung HPLC

Die Untersuchungen von Cortisol, Cortison, Metyrapon und Oracin als mögliche Substrate erfolgten mit Hilfe der HPLC. Die Zusammensetzungen der Ansätze unter reduzierenden bzw. oxidierenden Bedingungen sind exemplarisch in Tabelle 10 aufgeführt.

Reduktase-Aktivität (Cortison, Metyrapon, Oracin)		Dehydrogenase-Aktivität (Cortisol)	
Komponente	Konz.	Komponente	Konz.
K ₃ PO ₄ ; pH 7,4	100 mM	K ₃ PO ₄ ; pH 9,0	100 mM
NADPH	400 µM	NADP ⁺	400 µM
NADH	400 µM	NAD ⁺	400 µM
Substrat	500 µM	Cortisol	500 µM
Enzym	1-2 µg	Enzym	1-2 µg

Tabelle 10: Ansatzzusammensetzung für die Untersuchungen von Cortisol, Cortison, Metyrapon und Oracin als mögliche Substrate mittels HPLC.

Der Reaktionsansatz wurde 3-5 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 150 µL Ethylacetat versetzt, gemischt und zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen. Anschließend wurde zwei weitere Male analog extrahiert, die organischen Phasen vereint und das

Lösungsmittel mit Hilfe des SpeedVac®-Konzentrator bei 45°C entfernt. Rückstände wurden in 200 µL Laufmittel aufgenommen und auf die HPLC aufgebracht.

5.8.1.1 Cortison / Cortisol

Als Laufmittel diente ein 58:42-Gemisch von Methanol und Wasser (v/v). Die Flussrate betrug 0,6 mL/min. Es wurden 80 µL der Proben injiziert. Zur Bestimmung der Retentionszeiten wurden die Reinsubstanzen aufgegeben (30µL einer 10 µM-Lösung in Laufmittel). Als Positivkontrollen dienten Ansätze mit humanen Lebermikrosomen anstelle der Enzymlösung. Als Negativkontrolle dienten Ansätze, in denen die Lebermikrosomen zuvor 10 min bei 95°C inkubiert wurden. Gemessen wurde die Absorption bei 262 nm.

5.8.1.2 Metyrapon

Das Laufmittel bestand aus einem 70:30-Gemisch (v/v) aus 0,1% wässriger Ammoniumacetat-Lösung (w/v, pH 7,0) und Acetonitril. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Metyrapon wurde zur Bestimmung der Retentionszeit zusätzlich als Reinsubstanz aufgegeben (30 µL einer 50 µM-Lösung). Gemessen wurde die Absorption bei 254 nm. Die restliche Versuchsanordnung entsprach den unter 5.8.1.1 angegebenen Daten.

5.8.1.3 Oracin

Als Laufmittel diente ein 75:25-Gemisch (v/v) aus Puffer (10mM 1-Hexansulfonsäure mit 7,1 mL Triethylamin, pH 3,27 eingestellt mit Phosphorsäure) und Acetonitril. Die Flussrate betrug 1,5 mL/min, das Injektionsvolumen 100 µL. Für die Fluoreszenz-Detektion diente die Wellenlänge 340 nm als Anregung. Die gemessene emittierte Wellenlänge betrug 418 nm. Oracin wurde zur Bestimmung der Retentionszeit zusätzlich als Reinsubstanz aufgegeben (50 µM). Positiv- und Negativkontrolle wurden analog zu 5.8.1.1 angesetzt.

5.8.2 Substratscreening durch die photometrische Messung der Änderung der NAD(P)H-Konzentration

Für das Substratscreening unter Verwendung des Cary 100 Scan Photometer wurde der Zweistrahlmodus verwendet. Die Versuchsanordnung wurde mittels Wasserbad auf 25°C temperiert. Referenz- und Zielküvette wurden zunächst mit dem identischen Ansatz aus Puffer, Kofaktoren und Substratlösung befüllt (siehe Tabelle 11). Nach 1 min wurde der Zielküvette die Enzymlösung zugegeben und der Inhalt gemischt. Gemessen wurde die relative Abnahme der Absorption bei 340 nm, entsprechend der relativen Abnahme von NADPH und NADH, die bei der gewählten Wellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzen.

Die Abnahme der Absorption wurde für 2 min gemessen und anschließend durch eine Ausgleichsgerade die Steigung bestimmt. Positive Ergebnisse wurden durch eine Wiederholung der Messung mit hitzeinaktiviertem Enzym (10 min bei 95°C) bestätigt.

Komponente	Konzentration	Vol./ μL
K_3PO_4 / MgCl_2 / ZnCl_2 ; pH 7,4	125 mM / 20 μM / 20 μM	700
NADPH	8 mM	10
NADH	8 mM	10
Substrat	10 μM^{\dagger}	80
Enzym	100-200 ng/ μL	40

Tabelle 11: Ansatz für Substratuntersuchungen am Cary 100 Scan Photometer.

5.8.3 Substratscreening durch die fluorimetrische Messung der Änderung der NAD(P)H-Konzentration

Alternativ zur herkömmlichen Methode diente ein im Haus entwickelter Assay zur Substratuntersuchung unter Verwendung des Tecan GENios Pro. Gerät und Versuchsanordnung erlaubten durch Verwendung von 96-Well-Platten (COSTAR 96-Well Half Area Plates Flat Bottom) hier eine zeitgleiche Messung von mehreren Substraten in 100 μL -Ansätzen (siehe Tabelle 12).

[†] Manche Substanzen ließen sich nur weniger konzentriert lösen. Für abweichende Konzentrationen und Lösungsmittel siehe Tabelle 18.

Initiale Messung		Bestätigungsmessungen			
Komponente	A	1	2	3	4
Screening-Puffer	65 µL	95 µL	65 µL	90 µL	65 µL
Substrat 2 mM	25 µL	-	25 µL	-	25 µL
NADPH 1 mM	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Enzym	5 µL	-	5 µL ^u	5 µL	5 µL

Tabelle 12: Ansatzzusammensetzungen für Substratuntersuchungen unter Verwendung des Tecan GENios Pro. A: initiale Messung; 1-4: Kontrollmessungen zur Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen.

Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmung unter Verwendung der folgenden gerätespezifischen Einstellungen:

Software	XFLUOR4GENIOSPRO Version: V 4.64 ^v
Measurement mode:	Fluorescence
Excitation wavelength:	340 nm
Emission wavelength:	465 nm
Gain (Manual):	47
Number of reads per well:	10
Integration time:	40 µs
Lag time:	0 µs
Mirror selection:	50% mirror
Number of kinetic cycles:	20
Kinetic interval:	30 s

Tabelle 13: Gerätespezifische Einstellung für das Substratscreening unter Verwendung des Tecan GENios Pro.

Die Auftragung der Fluoreszenz in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) gegen die Zeit ermöglichte die Bestimmung der Steigung mittels linearer Regression. Ab einer Abnahme von 2 RFE / s wurden zur Bestätigung sechs Kontrollmessungen durchgeführt.

Neben einer erneuten Messung mit identischem Ansatz, wurden in anderen Ansätzen Substrat oder Enzym weggelassen bzw. das Enzym hitzeinaktiviert. Auf diese Weise sollte gewährleistet werden, dass man

^u Das Enzym wurde 10 min bei 95°C hitzeinaktiviert.

^v Zur schnellen Auswertung der Daten diente ein im Arbeitskreis entwickeltes VBA-Makro.

falsch-positive Ergebnisse durch eventuelle Reaktionen der Substrate mit einer der anderen Komponenten ausschließen kann.

6 Ergebnisse

6.1 Untersuchung von Biopsiematerial von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Für die Untersuchungen der Expressionslevel der Enzyme 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 und 2 konnte Biopsiegewebe von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) verwendet werden. Die mRNA-Expression von 11 β -HSD1 und 11 β -HSD2 in entzündeten Darmsegmenten wurde hierbei mit der in nicht-entzündetem Gewebe bzw. mit Darmgewebe von nicht betroffenen Patienten verglichen.

Insgesamt umfasste die Untersuchung 195 Individuen, wovon 120 an CED litten. Diese Gruppe der Patienten setzte sich aus je 60 Patienten mit CU (18-76 Jahre, Median 36,5 Jahre; davon 30 weiblich) und MC (18-69 Jahre, Median 36 Jahre; davon 31 weiblich) zusammen. Alle Patienten hatten eine aktive Entzündung im Darm (Colon) (Crohn's disease Activity Index, CDAI > 150 bzw. Colitis Activity Index, CAI \geq 4). Als Medikation waren Mesalazin (5-Aminosalicylsäure, 5-ASA) und Glucocorticoide, jedoch keine Immunsuppressiva oder Biopharmazeutika erlaubt.

Die allgemeine Kontrollgruppe bestand aus 30 Patienten (26-73 Jahre, Durchschnittsalter 54 Jahre, davon 16 weiblich) ohne pathologische Auffälligkeiten, die sich einer endoskopischen Untersuchung aufgrund von Veränderungen der Stuhlbeschaffenheit, Abdominalschmerzen oder gastrointestinalen Blutungen bzw. einer Krebsvorsorge unterzogen hatten.

Die krankheitsspezifische Kontrollgruppe (KSK) wiederum bestand aus 45 Individuen (18-76 Jahre, Durchschnittsalter 52 Jahre; davon 31 weiblich) mit Darmerkrankungen mit Ausnahme von CED. Die Patienten litten z. B. an infektiöser Diarrhöe, anderen Formen von gastrointestinalen Entzündungen oder dem Reizdarmsyndrom. Auch hier wurden Proben von entzündetem und nicht-entzündetem Gewebe entnommen.

6.1.1 11 β -HSD 1- und 11 β -HSD 2-Expression bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die oben beschriebene Untersuchung der unterschiedlichen Gewebeproben lieferte Ergebnisse mit hoher statistischer Signifikanz. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit MC und CU in entzündetem Darmgewebe die 11 β -HSD 1-Expression gegenüber nicht-entzündetem Gewebe hochreguliert ist (Abb. 6.1). Bei MC-Patienten betrug der Faktor 2,72 ($P \leq 0,01$), bei Patienten mit CU 3,82 ($P \leq 0,001$).

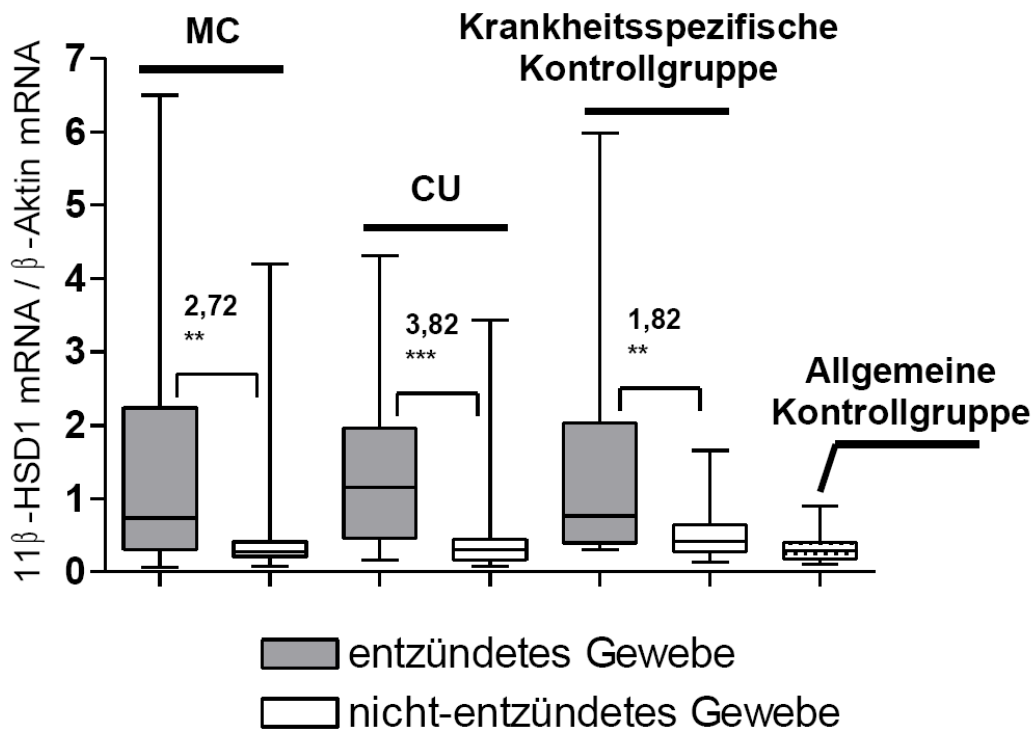


Abb. 6.1: Relative Transkriptlevels von 11 β -HSD 1 in Colonbiopsien von Patienten mit Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU), normalisiert auf β -Aktin. Der Boxplot zeigt das obere Quartil, Median und das untere Quartil. Die Fehlerbalken geben den jeweils kleinsten und größten Wert an. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet: ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test).

Eine verstärkte 11 β -HSD 1-Expression konnte auch bei der krankheitsspezifischen Kontrollgruppe (KSK) beobachtet werden. Hier betrug die Hochregulation in entzündetem Gewebe jedoch nur das 1,82-Fache im

Ergebnisse

Vergleich zu nicht-entzündetem Gewebe ($P \leq 0,01$). Die Proben aus nicht-entzündetem Gewebe der drei Gruppen zeigten wiederum nur geringfügig unterschiedliche Expressionslevel wie die Proben der allgemeinen Kontrollgruppe (MC: -1,02-fach; CU: 1,08-fach; KSK: 1,50-fach; negative Werte geben eine Herunterregulation an).

Interessanterweise konnte in entzündeten Geweben für 11 β -HSD 2 ein gegenteiliger Effekt wie für 11 β -HSD 1 gezeigt werden (Abb. 6.2).

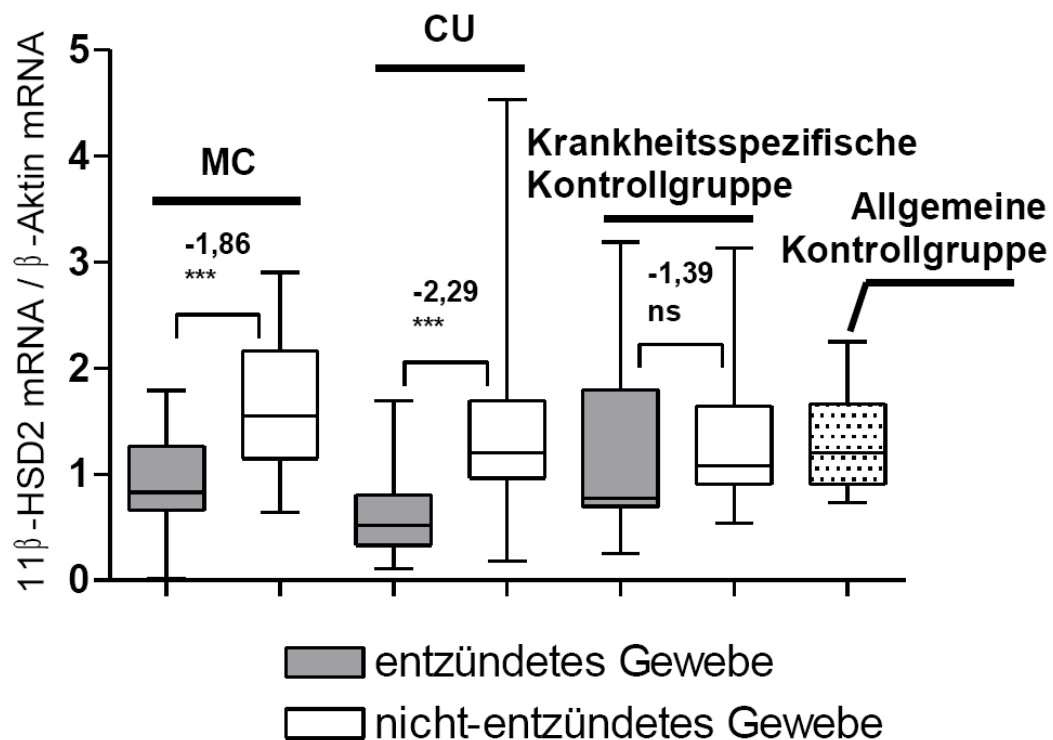


Abb. 6.2: Relative Transkriptlevels von 11 β -HSD 2 in Colonbiopsien von Patienten mit Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU), normalisiert auf β -Aktin. Der Boxplot zeigt das obere Quartil, Median und das untere Quartil. Die Fehlerbalken geben den jeweils kleinsten und größten Wert an. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet: *** $P \leq 0,001$; ns = nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).

Die Expression dieses Enzyms war bei Patienten mit MC um den Faktor 1,86 und bei Patienten mit CU um den Faktor 2,29 runterreguliert (beide $P \leq 0,001$). Auch hier zeigte sich nahezu kein Unterschied zwischen den Biopsien aus nicht-entzündetem Gewebe und denen der allgemeinen

Kontrollgruppe (MC: 1,29-fach; CU: -1,00-fach; KSK: -1,11-fach; negative Werte geben eine verminderte Expression an).

6.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression von 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2

Interessanterweise war der Anstieg der 11 β -HSD 1-Expression in entzündetem Gewebe bei männlichen Patienten deutlich ausgeprägter als bei weiblichen (Abb. 6.3). Bei weiblichen Patienten mit MC war der Transkriptlevel lediglich um den Faktor 1,81 erhöht (Ergebnis nicht signifikant), bei männlichen Patienten jedoch um den Faktor 4,83 ($P \leq 0,001$). Ein ähnliches Bild ergab sich bei Patienten mit CU. Hier war bei weiblichen Studienteilnehmern die 11 β -HSD 1-Expression um den Faktor 1,84 hochreguliert ($P \leq 0,05$), bei den männlichen Patienten sogar um den Faktor 6,51 ($P \leq 0,001$).

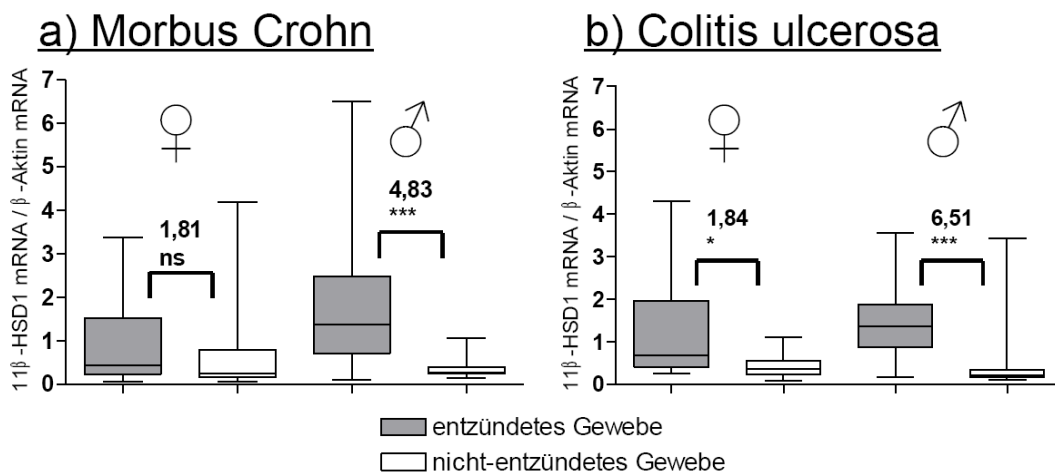


Abb. 6.3: Geschlechtsspezifische Expression von 11 β -HSD 1-mRNA in entzündetem Gewebe von Patienten mit Morbus Crohn (a) bzw. Colitis ulcerosa (b) verglichen mit nicht-entzündetem Gewebe (jeweils normalisiert β -Aktin). Der Boxplot zeigt das obere Quartil, Median und das untere Quartil; die Fehlerbalken geben den jeweils kleinsten und größten Wert an. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet: * $P \leq 0,05$; * $P \leq 0,001$; ns = nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).**

Im Gegensatz dazu konnten hinsichtlich der verminderten Expression von 11 β -HSD 2 keine deutlichen Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Patienten festgestellt werden (Abb. 6.4). Bei weiblichen MC-Patienten waren die 11 β -HSD 2-mRNA-Level um den Faktor 1,71

($P \leq 0,05$) vermindert, bei Männern um den Faktor 1,95 ($P \leq 0,001$). Bei Personen mit CU ergab sich ein ähnliches Bild. Die 11 β -HSD 2-mRNA-Expressionen waren 2,04-fach (Frauen, $P \leq 0,05$) bzw. 2,08-fach (Männer, $P \leq 0,001$) herunterreguliert.



Abb. 6.4: Geschlechtsspezifische Expression von 11 β -HSD 2-mRNA in entzündetem Gewebe von Patienten mit Morbus Crohn (a) bzw. Colitis ulcerosa (b) verglichen mit nicht-entzündetem Gewebe. Der Boxplot zeigt das obere Quartil, Median und das untere Quartil; die Fehlerbalken geben den jeweils kleinsten und größten Wert an. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet: * $P \leq 0,05$; * $P \leq 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test).**

Nach den Ergebnissen zur Änderung der Expression während des Entzündungsgeschehens und ihrer geschlechtsspezifischen Ausprägung stellte sich im Folgenden insbesondere für die 11 β -HSD 1 die Frage nach der Vermittlung ihrer transkriptionellen Regulation.

6.2 Entwicklung von Real-Time-PCR-Assays für die Transkriptvarianten P1 und P2 der 11 β -HSD 1

6.2.1 Sonden für quantitative Real-Time-RT-PCR

Das Gen der 11 β -HSD 1 wird durch zwei verschiedene Promotoren kontrolliert. Je nach Beteiligung des einen oder anderen Promotors

Assays. 5'-Primer und Sonde dürfen nicht an das jeweils andere Transkript binden.

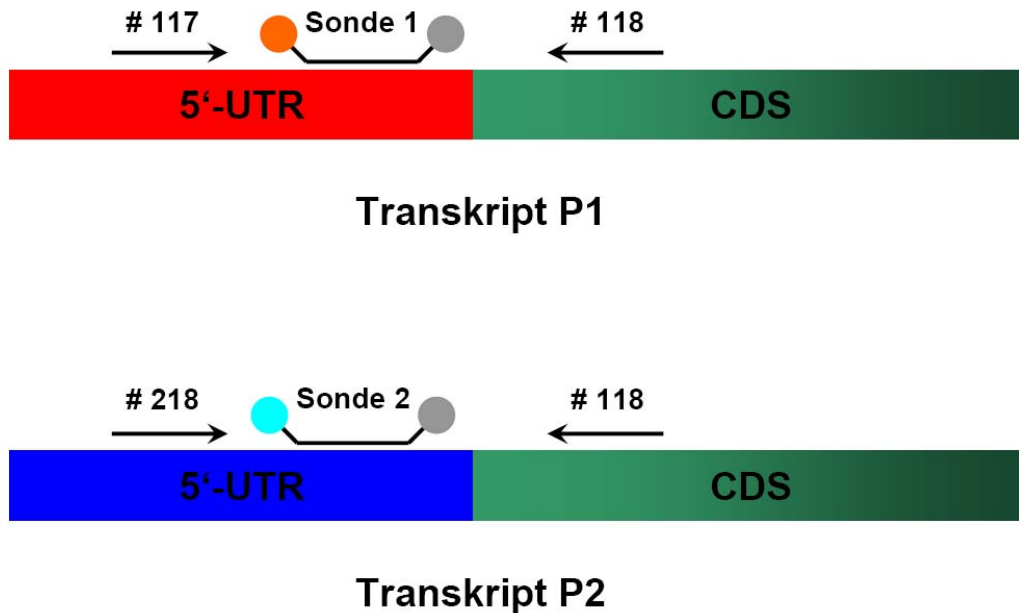


Abb. 6.6: Darstellung der Binderegionen der Primer und Sonden der entwickelten Real-Time-PCR-Assays.

Zur Überprüfung der Spezifität und der Effizienz sollten die Assays mit Ansätzen bekannter Transkriptzahlen getestet werden. Hierfür wurden Plasmide kommerziell erworben, die die jeweiligen Zielsequenzen beinhalten. Nach Transformation in den Bakterienstamm XL 1-Blue, Vervielfältigung und Isolierung der Plasmide konnte durch das bekannte Molekulargewicht eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt und so die absolute Transkriptzahl bestimmt werden. Auf diese Weise war es möglich, Standardreihen mit 10^2 bis 10^7 Kopien / μL zu erstellen und mit den Assays zu vermessen.

Zunächst wurde überprüft, ob die erzeugten Assays spezifisch arbeiteten, also nur eine der beiden Varianten detektierten. Hierfür wurden die Standardreihen der unterschiedlichen Transkripte getrennt im Duplexverfahren vermessen, d.h. ein Reaktionsansatz beinhaltete nur eine Transkriptvariante in einer bestimmten Konzentration aber beide 5'-Primer,

beide Sonden und den gemeinsamen 3'-Primer. Bei Spezifität sollte der jeweilige Assay, dessen entsprechendes Transkript nicht im Ansatz enthalten war im Verlauf der PCR-Reaktion auch kein Signal erzeugen.

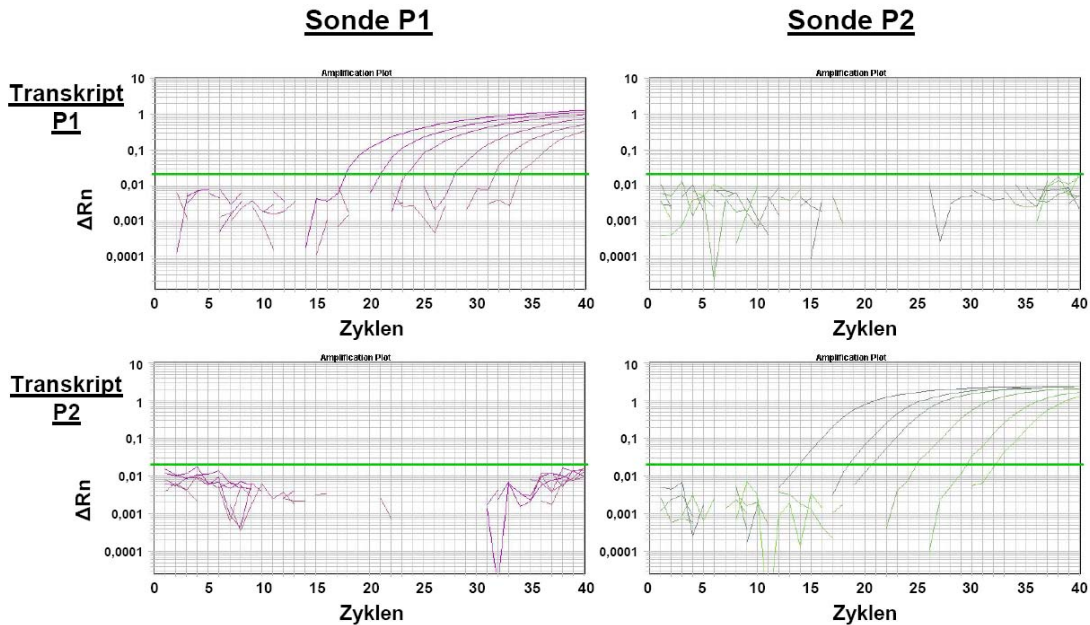


Abb. 6.7: Gezeigt sind die Untersuchungsergebnisse bezüglich der Spezifität der Real-Time-PCR-Assays für die Transkriptvarianten 1 und 2 der 11 β -HSD 1. Gemessen wurde jeweils eine Standardreihe mit bekannten DNA-Konzentrationen (10^2 bis 10^7 Kopien pro Ansatz) der zu untersuchenden Zielsequenzen. Aufgetragen ist das Fluoreszenzsignal gegen die Zyklenzahl. Die linken Abbildungen geben den Verlauf der Messungen mit dem Assay für Transkript P1, die rechten den der Messungen mit dem Assay für Transkript P2 wieder.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Assays nur die jeweilige Zielvariante detektierten. Hier wurden mit ansteigenden Mengen Template bei der entsprechenden Wellenlänge abnehmende C_T -Werte bestimmt (Abb. 6.7, links oben und rechts unten). Die andere Transkriptvariante wurde jeweils nicht detektiert (Abb. 6.7, rechts oben und links unten). Die kreierte Real-Time-PCR-Assays für die Quantifizierung der Transkriptvarianten zeigten somit Spezifität und bieten daher die Voraussetzung, sie in Duplex-Ansätzen verwenden zu können.

Für die Bestimmung der Effizienz der Assays wurden erneut Standardreihen vermessen. Hierbei wurden wieder 10^2 bis 10^7 Kopien pro Ansatz jeweils

vierfach bestimmt und die resultierenden C_T -Werte gegen die Konzentrationen aufgetragen (siehe Abb. 6.8).

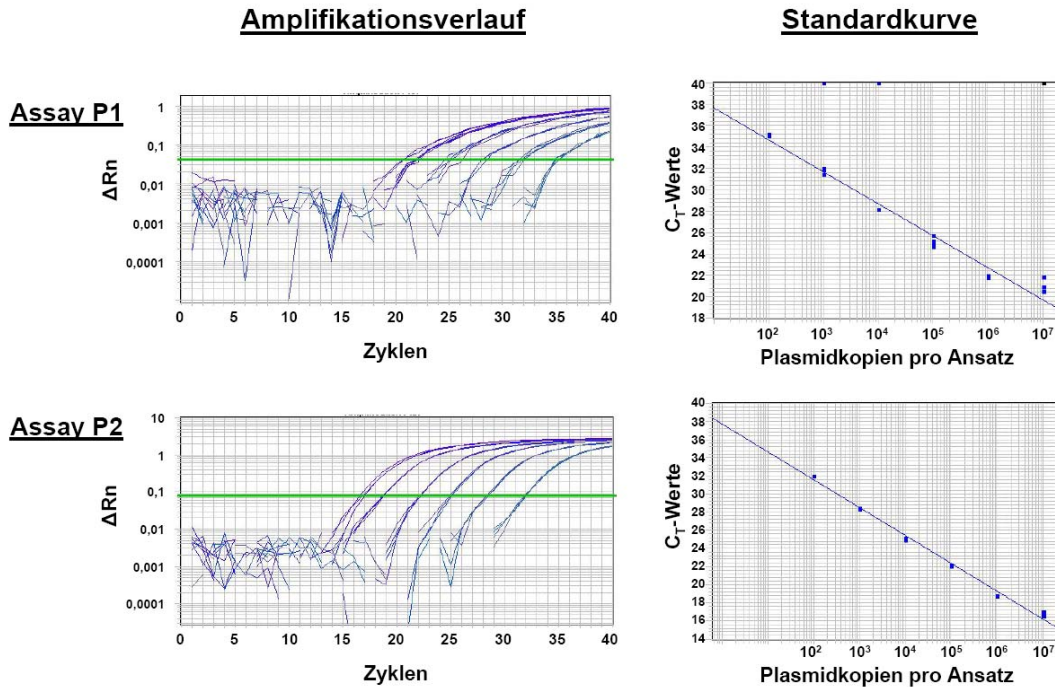


Abb. 6.8: Links: Amplifikationsverläufe der Assays für die Transkriptvarianten 1 und 2 der 11 β -HSD 1; rechts: Auftragung der C_T -Werte gegen die Plasmidkopien zur Errechnung der Effizienz mit Hilfe der Steigung der Geraden.

Man erhielt für beide Assays eine lineare Beziehung und die Effizienz konnte mit Hilfe der Steigung der Geraden nach folgender Formel bestimmt werden: $\text{Effizienz} = 10^{(-1 / \text{Steigung})} - 1$ [82].

Bei der idealen Steigung von -3,32 ergibt sich eine Effizienz von 1,00, entsprechend einer Verdopplung des Zielabschnitts pro Zyklus. Für den Assay P1 ergab sich eine Steigung von -3,00 und somit eine Effizienz von 1,15. Die Messungen für Assay P2 ergaben eine Steigung von -3,07 und eine folgende Effizienz von 1,12. Da die Werte größer als 1,00 sind, ist davon auszugehen, dass es zu unspezifischen Produktbildungen kommt. Die Abweichungen sind aber nahezu im Bereich der Zulässigkeiten von kommerziell erwerblichen Assays, wie z. B. TaqMan® Assays von Life Technologies ($1,00 \pm 0,1$).

6.2.2 Untersuchung der Transkriptvarianten P1 und P2 in humanen Gewebeproben mittels entwickeltem Real-Time-PCR-Assay

Nach Etablierung der Real-Time-PCR-Assays für die Transkriptvarianten P1 und P2 der 11 β -HSD 1 wurde damit die cDNA von unterschiedlichen Proben vermessen. Bei den Proben handelte es sich um eine humane Leber (38-jähriger männlicher Spender von kaukasischer Ethnie; Stratagene, La Jolla, CA, USA), fünf humane Lungenproben (alle männlich, 42-77 Jahre) und sechs humane subkutane Fettgewebeproben (Zen-Bio, Research Triangle Park, NC, USA).

Bei der Leberprobe und den Fettgewebeproben ließ sich ausschließlich das P2-Transkript nachweisen. In den Lungenproben ließ sich zusätzlich das P1-Transkript nachweisen, jedoch nur in Mengen kleiner als die des P2-Transkripts.

Da es sich bei den untersuchten Proben um Gewebetypen handelt, die typischerweise viel 11 β -HSD 1 exprimieren, ließ sich aufgrund der dominierenden bzw. ausschließlichen Präsenz des P2-Transkripts die Hypothese aufstellen, dass der Promotor 2 mit einer dauerhaft erhöhten Expression des Enzyms in Verbindung zu bringen ist. Dem Promotor 1 käme dann eventuell die Vermittlung kurzfristig veränderter Expressionslevel zu, wie sie z. B. während einer Entzündungsreaktion auftreten. Im Anschluss sollte deshalb versucht werden, diese Hypothese in einem geeigneten Zellversuch zu überprüfen.

6.3 Genexpressionsstudie: Zellversuche mit 5-Azacytidin

Zur Untersuchungen der Regulation von 11 β -HSD 1 wurden unterschiedliche Zelllinien (A431, A549, Caco-2, HCT116, HepG2, HT-29, Panc1, SW-480, TC7) auf ihre Expressionslevel von 11 β -HSD 1 untersucht. Als Krebszelllinien zeigten diese Zellen durchweg sehr niedrige Level von 11 β -HSD 1-mRNA. Dies steht im Einklang mit einer Studie von Gubbay *et al.* in der für die vier ovariellen Adenokarzinom-Zelllinien SKOV-3, BG-1, PEO-4 und PEO-14 niedrigere 11 β -HSD 1-Transkriptlevel nachgewiesen wurden,

als in entsprechenden Proben von nicht-krebsartig verändertem Gewebe des ovariellen Epithels [83].

Der Grund hierfür könnte in den die Zelldifferenzierung begünstigenden Eigenschaften des Cortisols liegen [84;85]. Erniedrigte Expression von 11 β -HSD 1 bei gleichzeitiger Erhöhung der Expression von 11 β -HSD 2 führen zu niedrigen Cortisol-Konzentrationen, die wiederum die zelluläre Proliferation begünstigen.

Daraufhin stellte sich die Frage, ob eventuell epigenetische Faktoren wie z. B. eine Promotor-Hypermethylierung ursächlich für die niedrigen Transkriptlevel in den untersuchten Krebszelllinien sein könnten. Es wurden daraufhin A431- und HT-29-Zellen mit dem Demethylierungsreagenz 5-Azacytidin behandelt, um anschließend die Effekte auf die mRNA-Expression von 11 β -HSD 1 zu untersuchen. 5-Azacytidin unterscheidet sich von seinem natürlichen Analogon Cytidin um ein Stickstoff-Atom, das an Position 5 im Pyrimidin-Ring ein Kohlenstoff-Atom ersetzt. Die Ringstruktur im 5-Azacytidin entspricht also einem 1,3,5-Triazin. Wird 5-Azacytidin anstelle von Cytidin in die DNA eingebaut, wird die Methylierung aufgrund des an der Position 5 im Ring vorhandenen Stickstoffs verhindert, da eine DNA-Methylierung nur an einem Kohlenstoffatom erfolgen kann [1].

Erste Untersuchungen mittels PCR unter Verwendung der Primer #29 und #30 für 11 β -HSD 1 zeigten deutliche Hochregulationen in beiden Zelllinien (für A431 siehe Abb. 6.9). Als Referenzgen diente β -Aktin, das mit den Primern #1 und #2 amplifiziert wurde und keine Regulation zeigte.

A431-Zellen, 72h, 5 μ M 5-Azacytidin

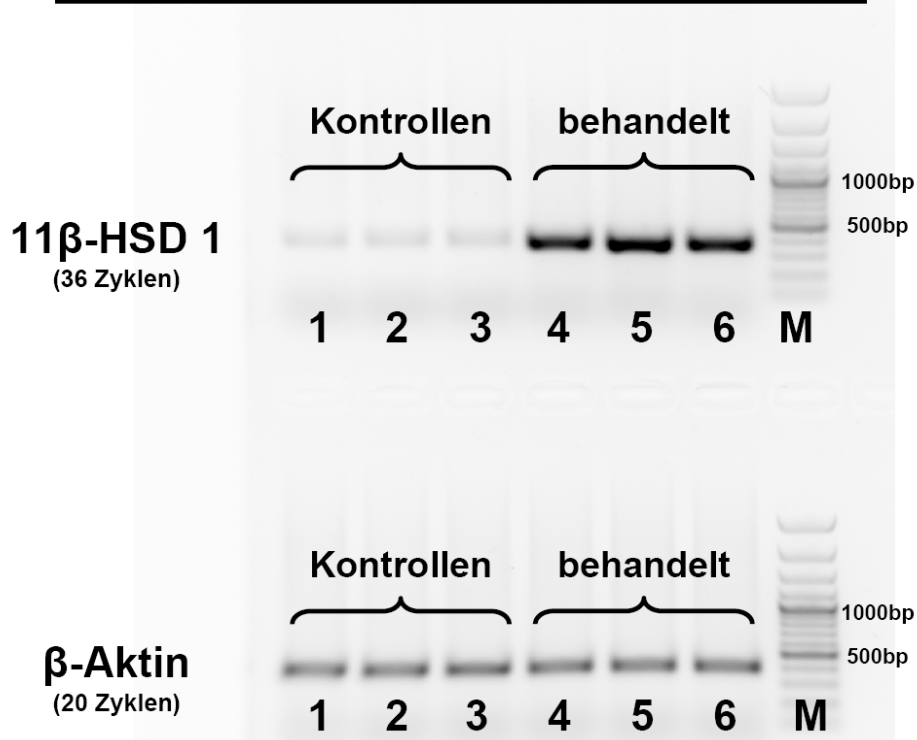


Abb. 6.9: Effekt von 5-Azacytidin auf die mRNA-Expression von 11 β -HSD 1 in A431-Zellen nach 72 h Behandlung. Die jeweiligen genspezifischen Regionen von 11 β -HSD 1 und des Referenzgens β -Aktin wurden mittels PCR amplifiziert und im Agarose-Gel aufgetrennt. Für die Behandlung mit 5-Azacytidin (Spuren 4-6) sowie für die Kontrollen (Spuren 1-3) wurden jeweils 3 unabhängige Zellkultur-Ansätze verwendet.

Bei der anschließenden Analyse der beiden Promotorregionen des *HSD11B1*-Gens mit Hilfe des UCSC Genome Browsers wurden allerdings keine CpG-Inseln gefunden. Unter der Annahme, dass diese erforderlich seien, um durch Methylierung bzw. Demethylierung regulativ zu wirken, drängte sich die Vermutung auf, dass die durch 5-Azacytidin erhöhte Transkription von 11 β -HSD 1 nur indirekt über einen der bekannten Transkriptionsfaktoren vermittelt wurde. An der Regulation des *HSD11B1*-Gens sind sowohl die CCAAT/Enhancer-Binding Proteine α (C/EBP- α) und β (C/EBP- β) sowie der Glucocorticoid-Rezeptor (GR) beteiligt [38;86-88].

In den Genen der für 11 β -HSD 1 bekannten Transkriptionsfaktoren C/EBP- α , C/EBP- β und des GR, konnten ausgeprägte CpG-Inseln gefunden werden. Bei der Überprüfung mittels PCR ließ sich jedoch nur beim GR eine

Erhöhung des Transkriptlevels feststellen, allerdings nur in der Zelllinie HT-29 (Abb. 6.10).

HT-29-Zellen, 72h, 5 μ M 5-Azacytidin

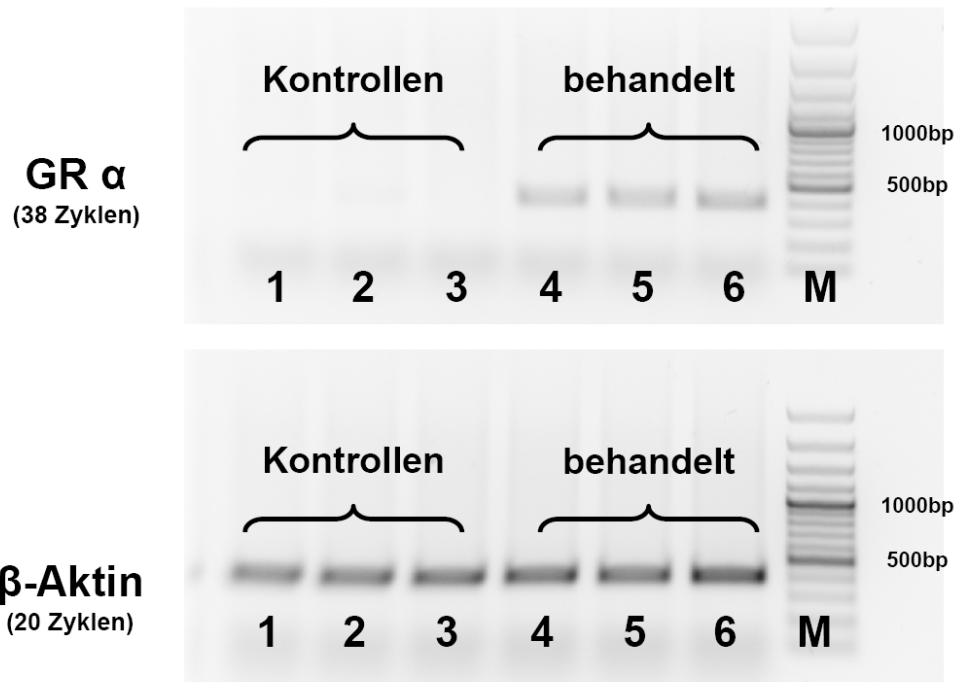


Abb. 6.10: Effekt von 5-Azacytidin auf die mRNA-Expression des Glucocorticoid-Rezeptor alpha (GR α) in HT-29-Zellen nach 72 h Behandlung. Die jeweiligen genspezifischen Regionen des GR α und des Referenzgens β -Aktin wurden mittels PCR amplifiziert und im Agarose-Gel aufgetrennt. Für die Behandlung mit 5-Azacytidin (Spuren 4-6) sowie für die Kontrollen (Spuren 1-3) wurden jeweils 3 unabhängige Zellkultur-Ansätze verwendet.

6.3.1 Bestimmung der Regulation von 11 β -HSD 1, 2 und GR in A431- und HT-29-Zellen mittels quantitativer Real-Time-RT-PCR

Das Ausmaß der Regulation der Gene von 11 β -HSD 1, 11 β -HSD 2 und des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) durch die Behandlung mit 5-Azacytidin wurde mittels quantitativer Real-Time-RT-PCR bestimmt.

Hierfür wurden die Proben nach 72 h Behandlung betrachtet. Die Zelllinie A431 zeigte im Einklang mit den vorangegangenen Experimenten eine um den Faktor 6,17 erhöhte Expression von 11 β -HSD 1 (n = 3) (Abb. 6.11).

A431-Zellen, 72h, 5 μ M 5-Azacytidin, qRT-PCR

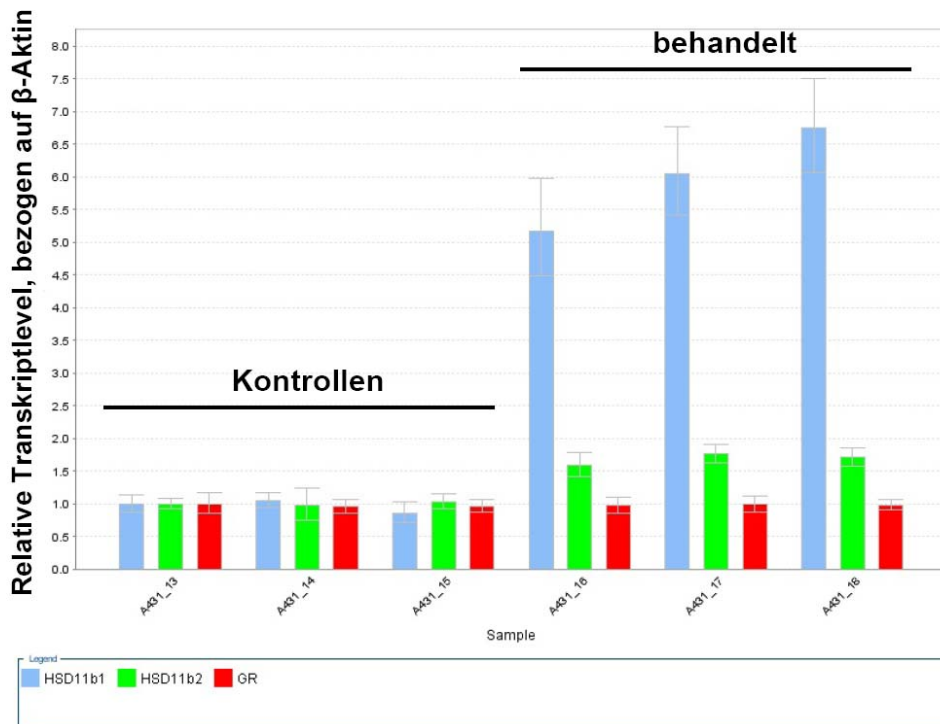


Abb. 6.11: Darstellung der Wirkung von 5-Azacytidin auf die relative Expression von 11 β -HSD 1 (blau), 11 β -HSD 2 (grün) und den Glucocorticoid-Rezeptor (rot) in der Zelllinie A431 nach 72 h. Gezeigt sind jeweils die drei Einzelerperimente der Kontrollen (Proben A431_13-15) und der behandelten Proben (Proben A431_16-18) in Dreifachbestimmung. Die Ergebnisse sind auf die Kontrolle A431_13 normiert, die willkürlich gleich eins gesetzt wurde. Als Referenzgen diente β -Aktin.

11 β -HSD 2 wurde lediglich geringfügig vermehrt exprimiert (Faktor 1,68). Die Expression des Glucocorticoid-Rezeptors blieb unverändert (Faktor 1,01).

Bei den Messungen der Expression von 11 β -HSD 1 in der Zelllinie HT-29 ergaben sich bei den Kontrollen hohe Standardabweichungen (Abb. 6.12). Die Dreifachbestimmungen der Einzelerperimente lieferten C_T -Werte, die sich um bis zu 1,46 Zyklen unterschieden. Ursache für diese Abweichungen könnten die sehr geringen Transkriptlevel sein. Die C_T -Werte der Kontrollen befanden sich im Bereich von 36 Zyklen, was einer ursprünglich einstelligen Kopienzahl entspricht [89]. Bei einer derart geringen Anzahl von Kopien

kommt es zwangsläufig zu großen Abweichungen in den resultierenden C_T -Werten.

Expression von 11 β -HSD1 in HT-29 nach 72h Behandlung mit 5-Azacytidin

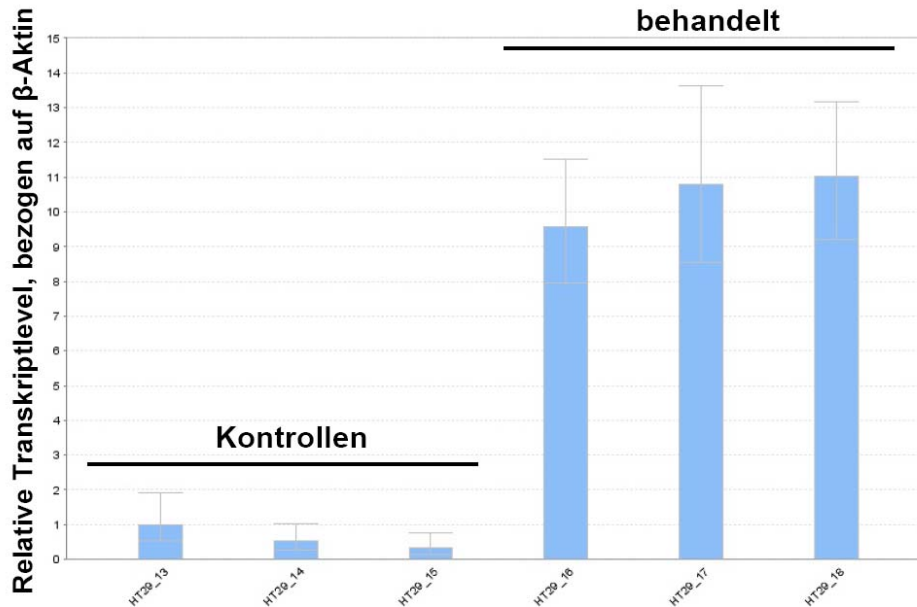


Abb. 6.12: Dargestellt ist die Wirkung von 5-Azacytidin auf die relative Expression von 11 β -HSD 1 in HT-29-Zellen nach 72 h. Gezeigt sind jeweils die drei Einzelerperimente der Kontrollen (Proben HT29_13-15) und der behandelten Proben (Proben HT29_16-18) in Dreifachbestimmung. Die Ergebnisse sind auf die Kontrolle HT29_13 normiert, die willkürlich gleich eins gesetzt wurde. Als Referenzgen diente β -Aktin.

Nach Bildung des Mittelwertes aus der relativen Expression der drei Einzelerperimente (Kontrollen und behandelte Proben) ergab sich eine um den Faktor 18,5 erhöhte Expression von 11 β -HSD 1. Dagegen wurde die Expression von 11 β -HSD 2 in HT-29 durch 5-Azacytidin nur minimal beeinflusst (Abb. 6.13).

Expression von 11 β -HSD2 in HT-29 nach 72h Behandlung mit 5-Azacytidin

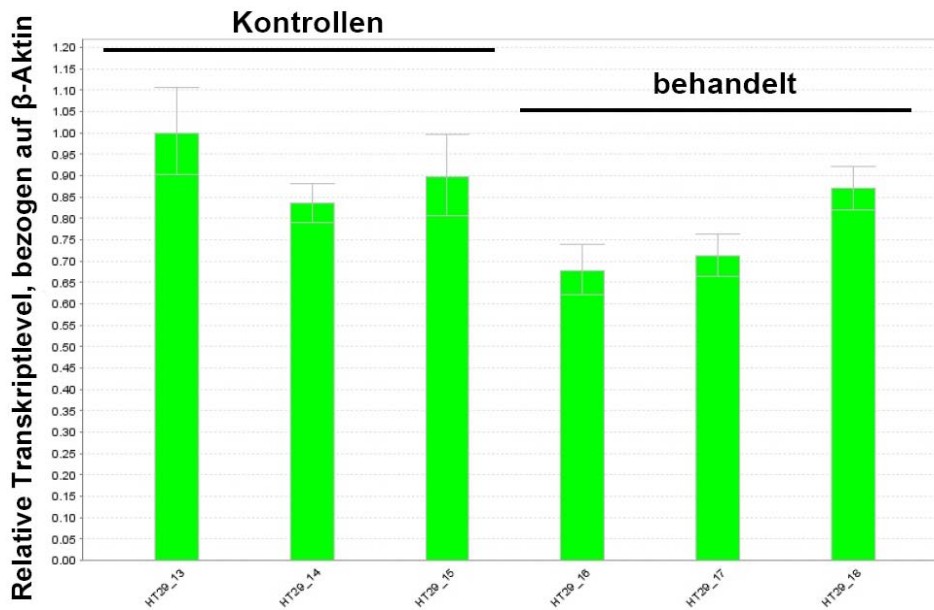


Abb. 6.13: Dargestellt ist die Wirkung von 5-Azacytidin auf die relative Expression von 11 β -HSD 2 in HT-29-Zellen nach 72 h. Gezeigt sind jeweils die drei Einzelerperimente der Kontrollen (Proben HT29_13-15) und der behandelten Proben (Proben HT29_16-18). Die Ergebnisse sind auf die Kontrolle HT29_13 normiert, die willkürlich gleich eins gesetzt wurde. Als Referenzgen diente β -Aktin.

Nach Bildung des Mittelwertes aus der relativen Expression der drei Einzelerperimente (Kontrollen und behandelte Proben) ergab sich eine um den Faktor 0,83 verminderte Expression.

Bei den Untersuchungen zur Expression des GRs zeigten sich erneut äußerst geringe Transkriptlevel bei den Kontrollen (Abb. 6.14). Eine Kontrolle lieferte in keiner der drei Einzelbestimmungen einen detektierbaren C_T -Wert. Bei den anderen beiden Kontrollen waren es nur ein bzw. zwei detektierbare C_T -Werte. Die behandelten Proben zeigten hingegen deutliche Expressionen mit C_T -Werten von 29 bis 30. Das Ausmaß der Hochregulation ließ sich jedoch aufgrund der geringen Werte für die Kontrollen in keinem sinnvollen Faktor erfassen.

Expression des GR in HT-29 nach 72h Behandlung mit 5-Azacytidin

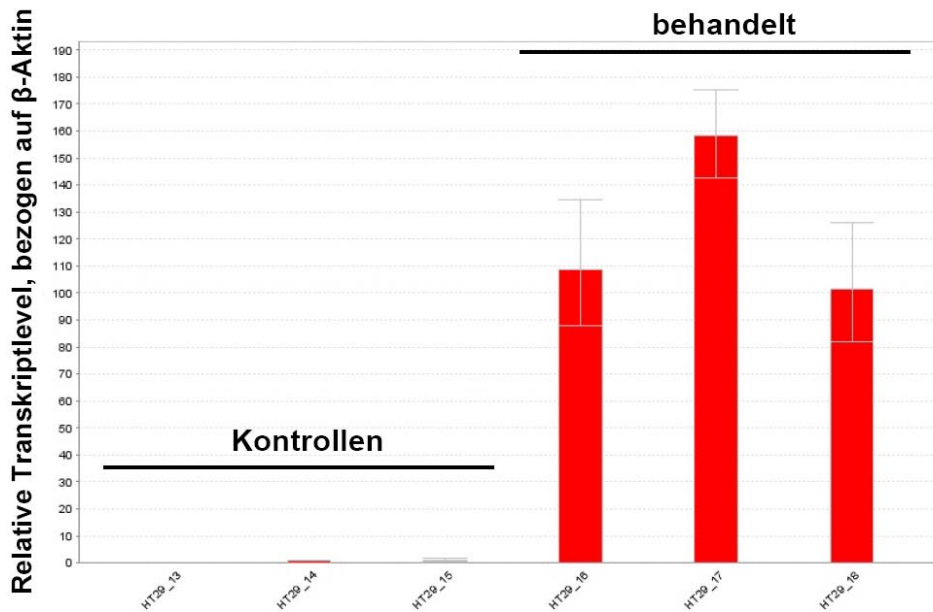


Abb. 6.14: Dargestellt ist die Wirkung von 5-Azacytidin auf die relative Expression des Glucocorticoid-Rezeptors in HT-29-Zellen nach 72 h. Gezeigt sind jeweils die drei Einzelexperimente der Kontrollen (Proben HT29_13-15) und der behandelten Proben (Proben HT29_16-18). Die Ergebnisse sind auf die Kontrolle HT29_15 normiert, die willkürlich gleich eins gesetzt wurde. Als Referenzgen diente β -Aktin.

6.3.2 Bestimmung des mittleren Methylierungsgrads der gDNA des GR nach Behandlung mit 5-Azacytidin

Zur Überprüfung, ob es auf Ebene der genomischen DNA durch die Behandlung mit 5-Azacytidin zu einer Demethylierung im Gen des Glucocorticoid-Rezeptors gekommen war, die ursächlich für die erhöhte Expression des Gens sein könnte, sollte der Methylierungsgrad im Promotorbereich des Gens bestimmt werden.

Hierfür wurden Zellen mit 5-Azacytidin behandelt, genomische DNA isoliert und diese nachfolgend einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Im Anschluss erfolgte eine PCR, um einen Bereich aus der CpG-reichen Region zu amplifizieren, der zuvor mit der PyroMark-Software (Qiagen, Hilden, Deutschland) bestimmt wurde. Verwendet wurden die Primer #507 und #508 (PCR-Programm im Anhang in Tabelle 15). Der Primer #508 war mit Biotin

markiert, was die Aufreinigung des PCR-Produkts über eine Bindung an Streptavidin ermöglichte. Nach Aufreinigung erfolgte die Sequenzierung der fraglichen Promotor-Region unter Verwendung des Primers #509.

Pro Zelllinie wurden insgesamt vier Proben untersucht (zwei behandelte Proben und zwei Kontrollen), die jeweils in fünf PCR-Ansätzen analysiert wurden. Zusätzlich wurden noch zwei Negativkontrollen (no template controls, NTC) mitgeführt, die statt des PCR-Produkts lediglich Wasser enthielten. Insgesamt wurden also 42 Ansätze sequenziert.

Die Ergebnisse waren aufgrund sehr geringer Intensitäten nur bedingt auszuwerten. Es kam zu hohen Schwankungen innerhalb der Mehrfachbestimmungen, die es nicht erlaubten, Rückschlüsse auf geänderte Methylierungsgrade zu ziehen. Der durchschnittliche Methylierungsgrad aller Proben einer Zelllinie betrug 36,5% für HT-29- und 7,5% für A431-Zellen.

6.3.3 Bestimmung der Proteinmenge von 11 β -HSD 1 mittels Western-Blot

Nachdem gezeigt wurde, dass es durch die Behandlung mit 5-Azacytidin in den Zelllinien A431 und HT-29 zu einer erhöhten Transkription der Gene von 11 β -HSD 1 und des Glucocorticoid-Rezeptors gekommen war, sollte mittels Western-Blot überprüft werden, ob dieser Effekt auch auf Proteinebene zu beobachten war. Hierfür wurden Langzeit-behandelte Proben verwendet und jeweils 75 μ g Protein auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle dienten aufgrund der Verfügbarkeit Mikrosomen aus Schweineleber, von denen 13,5 μ g aufgetragen wurden. Laut Angaben der Hersteller detektieren beide verwendeten Antikörper sowohl das menschliche Protein als auch das vom Schwein.

In Abb. 6.15 ist dokumentiert, dass es bei keiner der mit 5-Azacytidin behandelten Zelllinien zu einem Anstieg der Proteinmenge von 11 β -HSD 1 gekommen war. Die Doppelbande auf Höhe von etwa 38 kDa resultiert aus der Glykosylierung des Proteins [90].

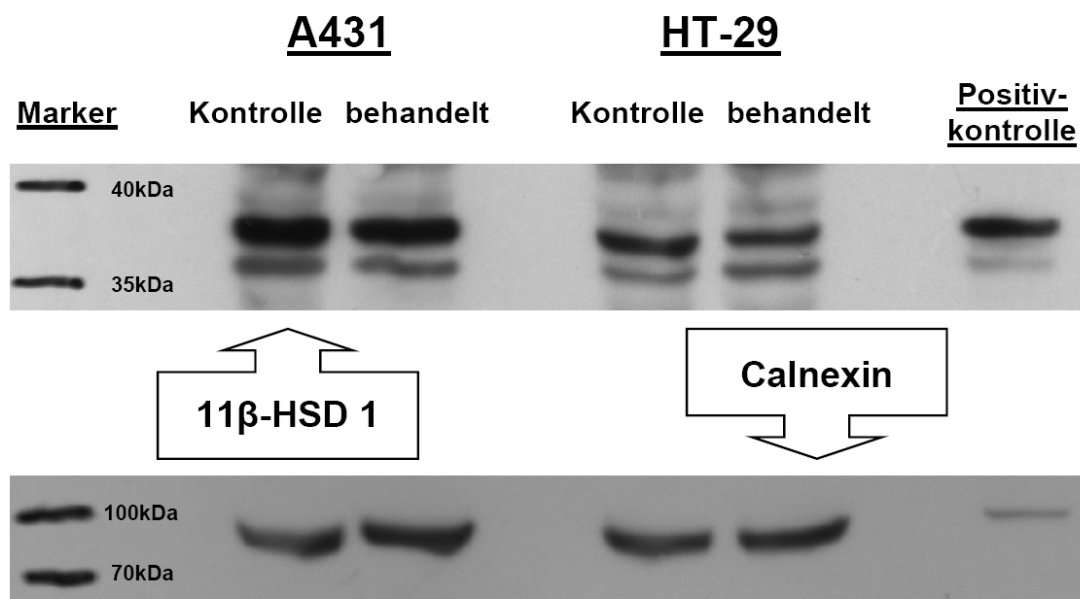


Abb. 6.15: Western-Blot der mit 5-Azacytidin behandelten A431- und HT-29-Zellen. Oben: 11β-HSD 1 mit der typischen Doppelbande des Proteins mit und ohne Glykosylierung bei ca. 38 kDa. Unten: Calnexin bei 90 kDa als Ladekontrolle. Als Positivkontrolle diente ein Pool von Mikrosomen aus Schweinelebern.

6.4 Klonierung der 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 3

Aufgrund der interessanten gewebespezifischen Expression von 11β-HSD 3 und der sich möglicherweise daraus ergebenden Rolle bei der Regulation von kognitiven Funktionen sollte eine rekombinante Herstellung des Proteins erfolgen. Hierfür wurden die Transkriptvarianten B und E gewählt. Transkriptvariante B war laut einer Veröffentlichung bereits erfolgreich kloniert, überexprimiert und als Hydroxysteroid Dehydrogenase charakterisiert worden [66]. Die Transkriptvariante E galt zu Beginn der Arbeit laut der *GenBank*®-Datenbank als Leitvariante, die das größte Protein kodierte.

Vergleicht man die mRNA der Transkriptvarianten B und E in einem Alignment (Abb. 6.16), so zeigt sich, dass sich die beiden Varianten nur darin unterscheiden, dass die Transkriptvariante E um ein Exon kürzer ist.

Ergebnisse

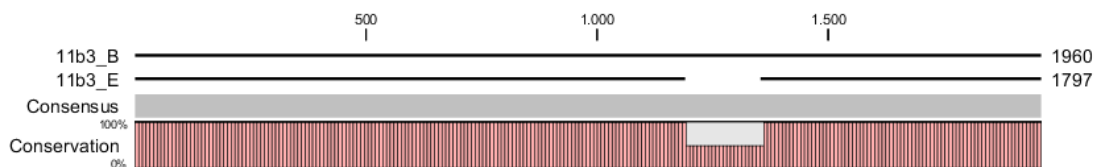


Abb. 6.16: Alignment der mRNA Transkriptvarianten B und E der 11 β -HSD 3 (abgekürzt 11b3).

Aufgrund des fehlenden Exons (163bp) kommt es zu einem Frameshift, was zur Folge hat, dass die Translation der Variante E erst später terminiert wird und Variante E trotz kürzerer mRNA ein längeres Protein kodiert (315 gegenüber 286 Aminosäuren).

Vermutlich aufgrund von sehr geringen Kopienzahlen, gelang es nicht, die Transkriptvarianten aus unterschiedlichen cDNA-Quellen (u.a. humane Leber-cDNA, humane Lungen-cDNA, diverse humane Zelllinien) mittels PCR heraus zu amplifizieren. Beide Transkriptvarianten wurden daraufhin als Plasmide kommerziell erworben (siehe 2.2). In Tabelle 14 sind die unterschiedlichen hergestellten Konstrukte aufgelistet.

11 β -HSD 3	Vektor	Bezeichnung des Konstrukts
Transkriptvariante B (GenBank®-Datenbank Reference Sequence: NM_198706)	pET-15b	B15b
	pET-32b	B32b
	pET-43b	B43b
Transkriptvariante E (GenBank®-Datenbank Reference Sequence: NM_198533)	pET-15b	E15b
	pET-32b	E32b
	pET-42b	E42b
	pET-43b	E43b

Tabelle 14: Liste der hergestellten Expressionsvektoren für die rekombinante Herstellung der Transkriptvarianten B und E der 11 β -HSD 3 und ihre Bezeichnungen.

6.4.1 Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante E

Das käuflich erworbene Plasmid mit der Transkriptvariante E konnte nach Vervielfältigung und Reinigung direkt in eine Schnittstellen-PCR eingesetzt werden.

6.4.1.1 Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante E in pET-15b

Nach Schnittstellen-PCR (Primer #205 und #206) und Aufreinigung wurden das Insert und der Vektor mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nde*I verdaut. Im Anschluss erfolgten die Ligation und die Transformation von XL 1 Blue-Zellen mit dem Ligationsansatz. Nach Vervielfältigung und Isolierung des so hergestellten Expressionsvektors konnte die erfolgreiche Klonierung durch Sequenzierung bestätigt werden.

Mit diesem Vektor wurden im Anschluss zunächst Zellen des Expressionsstamms Origami (DE3) transformiert. Es folgte eine Überexpression nach Standardbedingungen. Die berechnete molekulare Masse des überexprimierten Proteins beträgt 36,6 kDa. Eine entsprechende Bande ließ sich mittels SDS-PAGE weder nach der Überexpression und Aufschluss der Zellen noch nach der Aufreinigung der löslichen Fraktion mittels Nickel-Affinitätschromatographie feststellen.

Es folgte die Transformation von Zellen des Stamms BL21 (DE3)-R3-pRARE2. Auch hier ließ sich keine erfolgreiche Überexpression dokumentieren.

Die Transformation von Zellen des Stamms Tuner (DE3) pLys sollte die Möglichkeit eröffnen, mit geringeren IPTG-Konzentrationen schonende Bedingungen während der Überexpression zu gewährleisten. Es wurde eine geringere IPTG-Konzentration von 0,3 mM statt 1 mM als Konzentration gewählt. Bei Tuner-Zellen ist die Geschwindigkeit der Überexpression durch die IPTG-Konzentration steuerbar. Obwohl mit einer Konzentration von 0,3 mM IPTG eine langsamere Überexpression zu erwarten war, kann dies u. U. vorteilhaft sein. Auch unter Verwendung von Tuner (DE3) pLys als Expressionsstamm bei geringerer IPTG-Konzentration konnte keine erfolgreiche Überexpression dokumentiert werden.

Da ein Wachsen der Zelldichte auf $OD_{600nm} = 0,5-0,7$ AU in allen Fällen problemlos vonstatten ging, drängte sich der Verdacht auf, dass das entstehende Protein toxisch für den verwendeten Bakterienstamm sein könnte. Als Folge wurden die Expressionsstämme C41 (DE3) und C43 (DE3) verwendet, die laut Hersteller eine höhere Toleranz gegenüber toxischen

Proteinen haben sollen. Eine Überexpression unter Standardbedingungen führte jedoch auch hier nicht zu mittels SDS-PAGE detektierbaren Mengen Protein.

6.4.1.2 Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante E in pET-32b

Der durch den Expressionsvektor pET-32b vermittelte *Trx-Tag* sollte die Löslichkeit und Stabilität des Zielproteins erhöhen [71]. Bei der Klonierung diente das kommerziell bezogene Plasmid (IMAGE ID:100015977, siehe 2.2) als Template. Für die Schnittstellen-PCR wurden die Primer #226 und #227, für den folgenden Restriktionsansatz die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* verwendet. Nachdem durch Sequenzierung die erfolgreiche Klonierung bestätigt wurde, wurden Bakterien des Expressionsstamms Origami 2 (DE3) pLys transformiert.

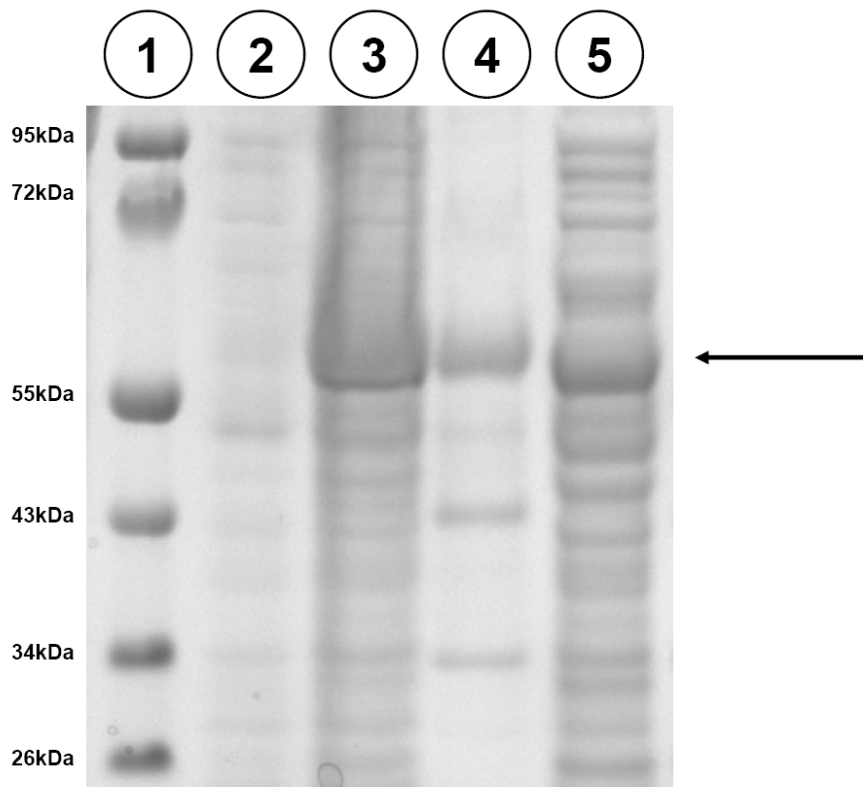


Abb. 6.17: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Dokumentation der Überexpression von E32b in Origami 2 (DE3) pLys (Legende: 1. Proteinmarker; 2. Bakterienkultur vor Induktion mit IPTG; 3. Bakterienkultur am Ende der Überexpression; 4. unlösliche Fraktion nach Aufschluss; 5. Überstand nach Aufschluss).

Es ließ sich mittels SDS-PAGE eine deutliche Überexpressions zeigen (siehe Pfeil in Abb. 6.17). Die Bande, die laut Protein-Leiter etwas schwerer als die berechneten 53,4 kDa ist, zeigte sich scheinbar auch in der löslichen Fraktion.

Es wurde daraufhin versucht, den Überstand mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufzureinigen. Die erhaltenen Fraktionen lieferten jedoch keine erkennbaren Banden passender Höhe auf einem SDS-Gel.

Im Anschluss wurde der Expressionsstamm BL21 (DE3)-R3-pRARE2 mit dem Plasmid E32b transformiert. Bei einer folgenden Überexpression zeigte sich hier nur in der unlöslichen Fraktion eine passende Bande. Ein Western-Blot mit den unterschiedlichen Fraktionen unter Verwendung eines Anti-His-Tag-Antikörpers (siehe Abb. 6.18) bestätigte das Ergebnis.

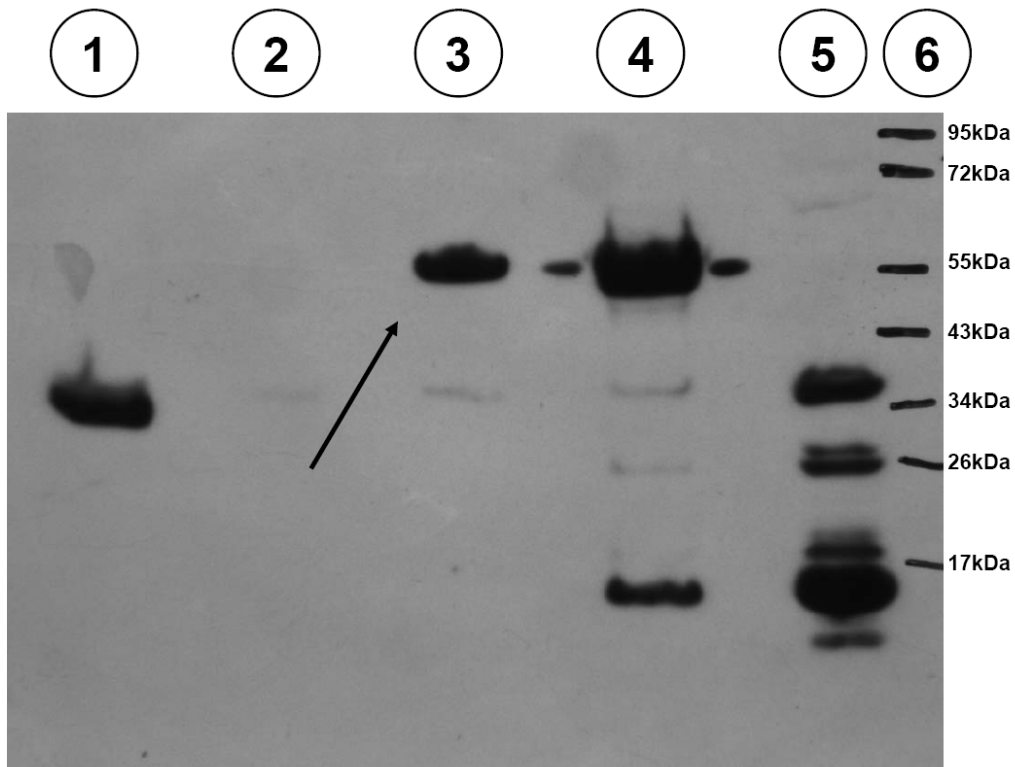


Abb. 6.18: Western-Blot mit Anti-*His-Tag*-Antikörper mit Fraktionen von E32b aus BL21 (DE3)-R3-pRARE2. Die nach Induzierung neu hinzugekommene Bande ist mit dem Pfeil gekennzeichnet (Legende: 1. Positivkontrolle, rekombinant hergestelltes Protein CBR 1; 2. Bakterienkultur vor Induktion mit IPTG; 3. Bakterienkultur am Ende der Überexpression; 4. unlösliche Fraktion nach Aufschluss; 5. Überstand nach Aufschluss; 6. Proteinmarker).

Der Western-Blot zeigte in der Bahn der Probe vom Ende der Überexpression eine passende Bande, die vor Induktion mit IPTG noch nicht vorhanden war (Pfeil Bahn Nr. 3 in Abb. 6.18). Die gleiche Bande zeigt sich auch in der unlöslichen Fraktion. Im Überstand hingegen wurde keine Bande mit passender Höhe detektiert. Dafür zeigten sich mehrere Banden mit niedrigeren Molekulargewichten, die auf unspezifische Bindungen oder Fragmentierung des Zielproteins durch den Aufschluss mittels Ultraschallbehandlung zurückzuführen sind.

Analog zum Konstrukt im Vektor pET-15b wurde im Anschluss deshalb versucht, unter Verwendung des Expressionsstamms Tuner (DE3) pLys eine Überexpression unter schonenderen Bedingungen durchzuführen. Neben IPTG-Konzentrationen von 0,3 mM wurden auch Zeit und Temperatur nach Induktion variiert (5 h, 25°C bzw. 18 h, 18°C). Es ließen sich dennoch keine detektierbaren Mengen an Protein in der löslichen Phase finden.

Zu guter Letzt wurde das pET-32b-Konstrukt in den Bakterienstamm C43 (DE3) transformiert. Auch hier ließen sich nach erfolgreicher Überexpression nur in der unlöslichen Fraktion deutliche Mengen an Protein im SDS-Gel detektieren. Auf eine Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie wurde daraufhin verzichtet.

6.4.1.3 Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante E in pET-42b

Der durch den Vektor pET-42b vermittelte *GST-Tag* soll dem Fusionsprotein eine höhere Löslichkeit verleihen. Es wurde dasselbe Insert wie schon bei der Klonierung in pET-32b verwendet (siehe 6.4.1.2). Der Erfolg der Klonierung konnte erneut mittels Sequenzierung bestätigt werden. Das Fusionsprotein hat die berechnete molekulare Masse von 68,0 kDa.

Nach der Transformation der Expressionsstämme BL21 (DE3)-R3-pRARE2, Origami 2 (DE3) pLys und Tuner (DE3) pLys konnten durch SDS-PAGE erfolgreiche Überexpressionen gezeigt werden. Entsprechende Banden zeigten sich jedoch erneut nur in der unlöslichen Fraktion (Abb. 6.19).

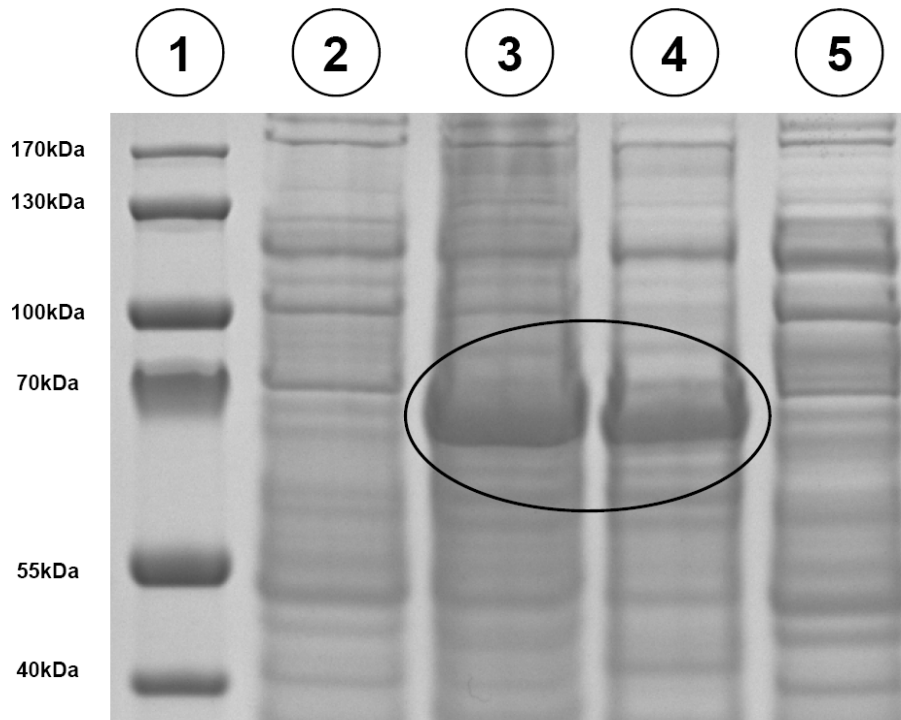


Abb. 6.19: SDS-Gel nach Überexpression von E42b in BL21 (DE3)-R3-pRARE2. Deutlich zu sehen sind die neu hinzugekommenen Banden bei 68 kDa in der Probe vom Ende der Überexpression und der unlöslichen Fraktion (Bahnen 2 und 3, eingekreist). Die Bahn des löslichen Überstands zeigt diese Bande nicht (Legende: 1. Proteinmarker; 2. Bakterienkultur vor Induktion mit IPTG; 3. Bakterienkultur am Ende der Überexpression; 4. unlösliche Fraktion nach Aufschluss; 5. Überstand nach Aufschluss).

6.4.1.4 Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante E in pET-43b

Auch hier wurde das Insert verwendet, welches mit den Primern #226 und #227 und anschließendem Verdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* erzeugt wurde (siehe 6.4.1.2). Der durch pET-43b vermittelte *Nus-Tag* soll eine noch größere Löslichkeit vermitteln als die zuvor verwendeten Proteine *Trx-* und *GST-Tag* aus pET-32b bzw. pET-42b. Die berechnete molekulare Masse des Fusionsproteins beträgt 96,4 kDa.

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde das Plasmid in BL21 (DE3)-R3-pRARE2 transformiert. Die folgende Überexpression zeigte erstmals auch deutliche Mengen an Protein in der löslichen Fraktion nach Aufschluss (Abb. 6.20).

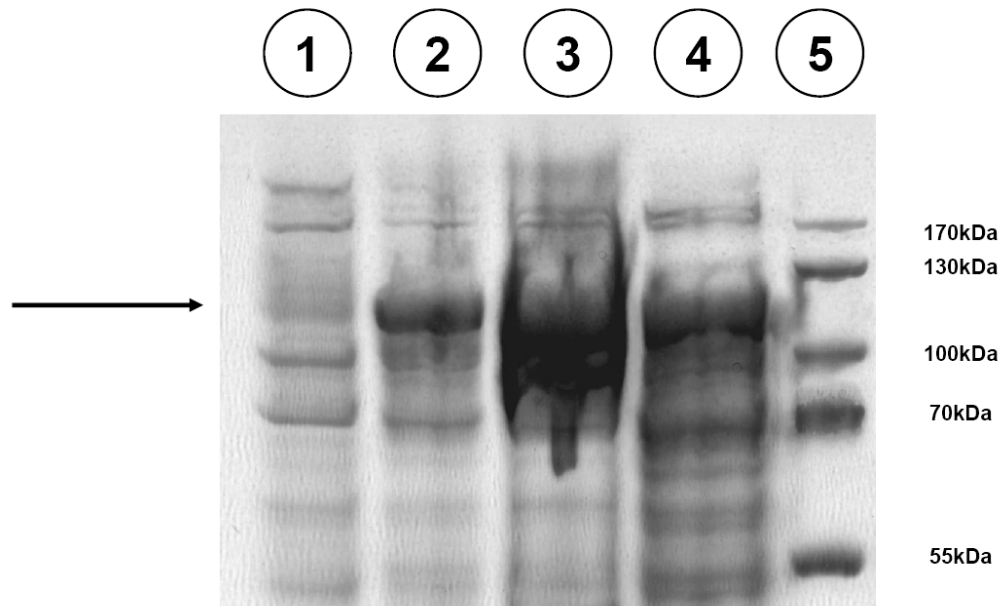


Abb. 6.20: SDS-Gel nach Überexpression von E43b in BL21 (DE3)-R3-pRARE2. Deutlich zu sehen ist die neu hinzugekommene Bande bei etwa 110 kDa in Bahn 2 (Pfeil). Sie zeigt sich auch in der unlöslichen sowie der löslichen Fraktion (Legende: 1. Bakterienkultur vor Induktion mit IPTG; 2. Bakterienkultur am Ende der Überexpression; 3. unlösliche Fraktion nach Aufschluss; 4. Überstand nach Aufschluss; 5. Proteinmarker).

Das Laufverhalten des Fusionsproteins im SDS-Gel suggeriert, dass das tatsächliche Molekulargewicht deutlich höher ist als das berechnete. Dieses als „gel shifting“ bezeichnete Phänomen findet seine Ursache in unterschiedlich ausgeprägten Verhältnissen von Detergenz zu Protein, die u. a. durch hydrophobe Regionen im Protein, wie z. B. bei Membranproteinen, entstehen [91;92]. Ein fehlendes Stoppcodon und eine daraus resultierende längere Transkription konnte aufgrund der erfolgten Sequenzierung als Ursache ausgeschlossen werden.

Eine anschließende Aufreinigung erfolgte mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Die Dokumentation durch SDS-PAGE lieferte eine einzelne Bande (Abb. 6.21).

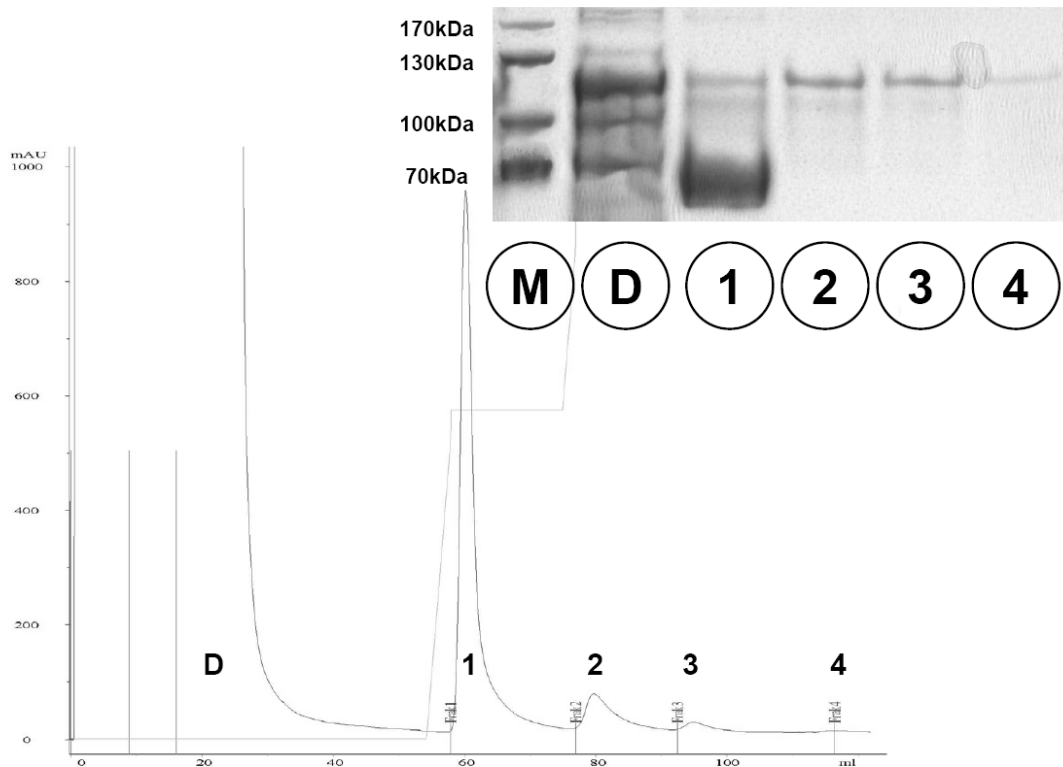


Abb. 6.21: Gezeigt ist das Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie der Überexpression von E43b in BL21 (DE3)-R3-pRARE2 und das SDS-Gel der entsprechenden Fraktionen (Legende: M. Proteinmarker; D+1-4. Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie).

Die gereinigte Fraktion wurde anschließend mit Thrombin verdaut, um den *Nus-Tag* vom Zielprotein abzuspalten. Aufgrund der Position der Thrombinschnittstelle im Fusionsprotein würden beide Fragmente einen *His-Tag* tragen.

Auf dem entsprechenden SDS-Gel tauchte schon unmittelbar nach Beginn der Inkubation eine neue Bande auf Höhe von etwa 65 kDa auf, die dem abgespaltenen *Nus-Tag*-Fragment entsprechen könnte (Abb. 6.22, oberer Kasten; berechnete molekulare Masse 58,9 kDa). Zusätzlich war während des Verlaufs des Verdaus nur eine äußerst schwache Bande auszumachen, die dem Fragment des Zielproteins entsprechen könnte (Abb. 6.22, unterer Kasten). Aufgrund der Abwesenheit der Ausgangsbande bei etwa 110 kDa nach 22 h wurde angenommen, dass der Verdau vollständig war.

Ergebnisse

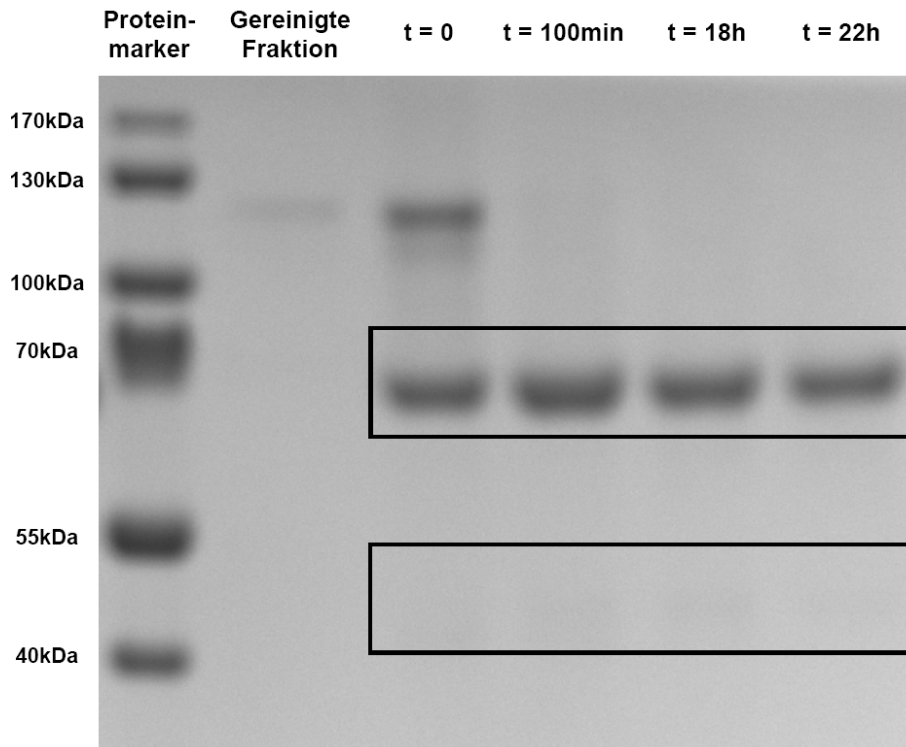


Abb. 6.22: Das SDS-Gel zeigt den zeitlichen Verlauf des Thrombinverdaus nach Überexpression von E43b in BL21 (DE3)-R3-pRARE2 und Aufreinigung von Beginn der Reaktion ($t = 0$) bis zum Abbruch nach 22 h.

Für eine erneute Reinigung mit Hilfe des Äkta-Purifiers zum Erhalt des reinen Zielproteins musste umgepuffert werden, um störende Mengen von Imidazol zu entfernen. Bei der Umpufferung bildete sich ein farbloser Niederschlag. Vor erneuter Aufgabe auf die Säule des Äkta-Purifiers wurde der Überstand sterilfiltriert. Das SDS-Gel nach Nickel-Affinitätschromatographie zeigte nur noch eine Bande auf Höhe von etwa 65 kDa. Es ist zu vermuten, dass das abgespaltene Zielprotein während der Umpufferung ausgefallen und an der Membran adsorbiert war bzw. im Sterilfilter zurückgehalten wurde.

Aufgrund des erfolglosen Versuchs der Aufreinigung erfolgten die Untersuchungen bezüglich möglicher Substrate mit dem Gesamtkonstrukt. Hierbei ließen sich weder bei der Untersuchung mittels HPLC noch mit der Methode unter Verwendung des Tecan GENios Pro mögliche Substrate finden (Liste der untersuchten Substanzen im Anhang in Tabelle 18).

6.4.2 Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante B

Der kommerziell bezogene Klon für die Transkriptvariante B zeigte eine Mutation gegenüber der in der *GenBank*®-Datenbank verfügbaren Sequenz. An Position 431 der kodierenden Sequenz befand sich im bezogenen Klon ein Guanin statt eines Adenins (a431g). In der Aminosäuresequenz würde diese Mutation zu einem Austausch von Glutamin durch Arginin an Position 143 der Sequenz führen. Die Mutation wurde deshalb mittels zielgerichteter Mutagenese wieder rückgängig gemacht.

Hierfür wurde zunächst Plasmid isoliert, eine Schnittstellen-PCR unter Verwendung der Primer #304 und #248 vollzogen und das mit *EcoRI* und *XhoI* verdaute Insert in den Vektor pET-32b kloniert. Der Erfolg wurde durch Sequenzierung bestätigt. Im Anschluss erfolgte die Mutagenese (siehe 4.8.5), deren Erfolg sich ebenfalls durch Sequenzierung bestätigen ließ.

6.4.2.1 Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante B in pET-15b

Als Template für die Schnittstellen-PCR diente das B32b-Plasmid nach Mutagenese (s. o.). Nach der Aufreinigung wurden Insert und Vektor mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *NdeI* verdaut. Im Anschluss erfolgte die Ligation und dann die Transformation in XL 1 Blue. Der Erfolg der Klonierung ließ sich auch hier mittels Sequenzierung bestätigen.

Im Anschluss wurde das Plasmid in die Expressionsstämme BL21 (DE3)-R3-pRARE2, Origami 2 (DE3) pLys und unter der Vermutung der Toxizität des entstehenden Proteins auch in die Stämme C41 (DE3) und C43 (DE3) transformiert. Analog zur Transkriptvariante E ließ sich auch hier keine erfolgreiche Überexpression beobachten.

6.4.2.2 Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante B in pET-32b

Nach der erfolgreichen Ligation und Mutagenese (s. o.) wurde das Plasmid zunächst in die Expressionsstämme BL21 (DE3)-R3-pRARE2 und Origami 2 (DE3) pLys transformiert. Bei der Überprüfung mittels SDS-PAGE zeigten sich in beiden Fällen keine deutlichen Mengen in der löslichen Fraktion. Auch

Ergebnisse

der anschließende Versuch der Überexpression in den Stämmen Tuner (DE3) pLys und C43 (DE3) lieferte dasselbe Ergebnis.

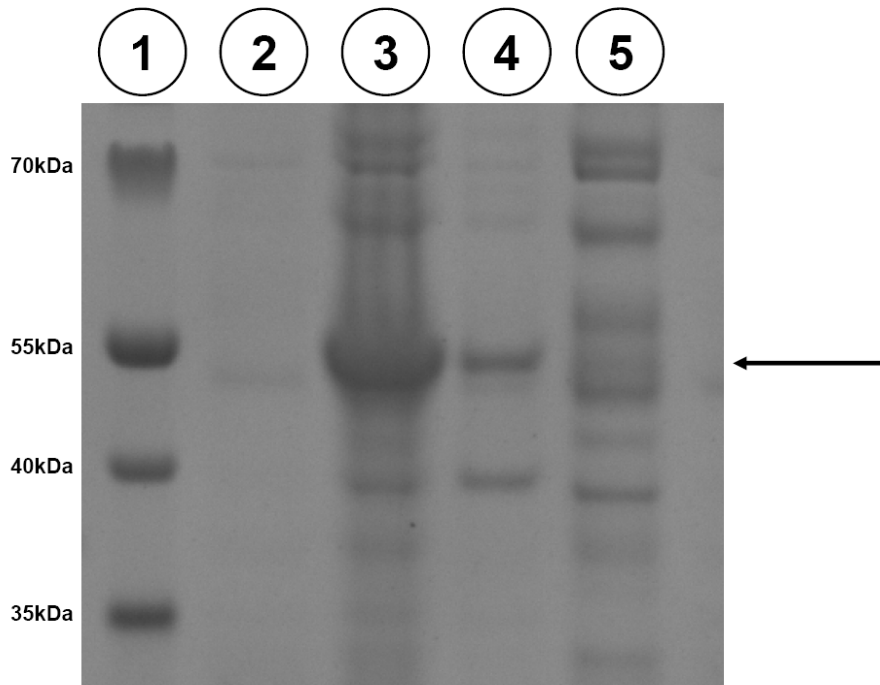


Abb. 6.23: Dokumentation der Überexpression von B32b in C43 (DE3). Zu sehen ist eine zum Ende der Überexpression neu hinzugekommene Bande auf Höhe von etwa 55 kDa (Pfeil), die sich deutlich auch in der unlöslichen Fraktion zeigt (Legende: 1. Proteinmarker; 2. Bakterienkultur vor Induktion mit IPTG; 3. Bakterienkultur am Ende der Überexpression; 4. unlösliche Fraktion nach Aufschluss; 5. Überstand nach Aufschluss).

Nach der Überexpression in C43 (DE3) wurde die lösliche Fraktion mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Ein SDS-Gel der gesammelten Fraktionen zeigte eine passende Bande auf Höhe der 55 kDa-Bande des Proteinmarkers (Abb. 6.24). Die berechnete molekulare Masse der Transkriptvariante B in pET-32b beträgt 49,9 kDa.

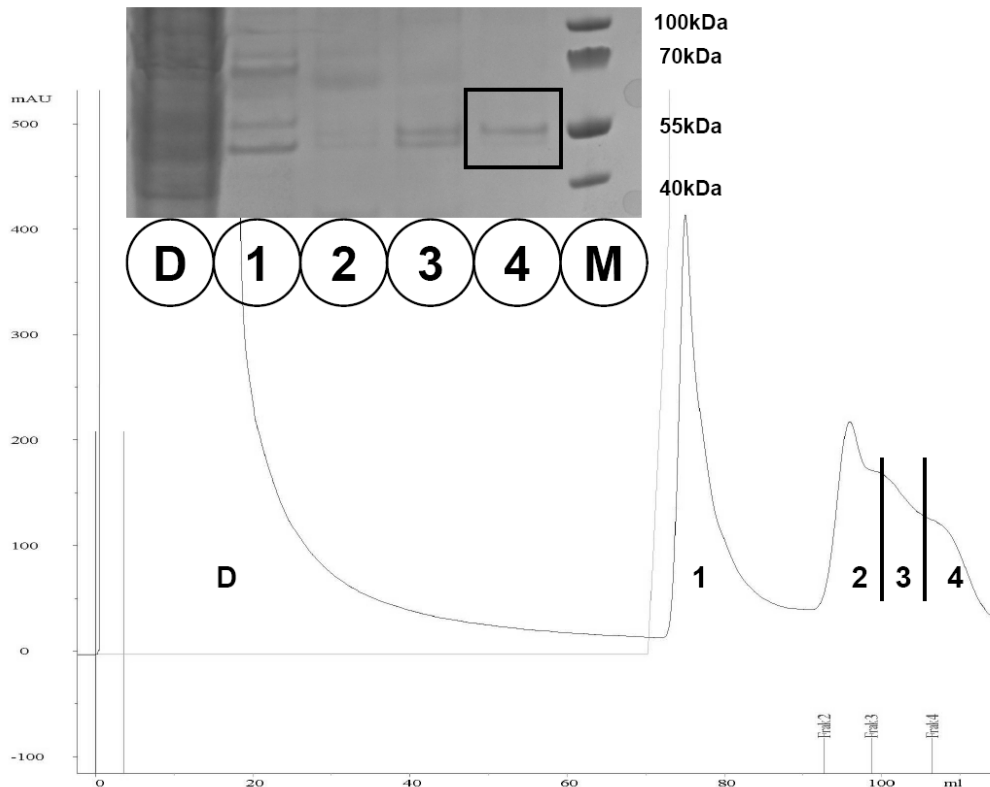


Abb. 6.24: Gezeigt ist das Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie der Überexpression von B32b in C43 (DE3) und das Coomassie-gefärbte SDS-Gel der entsprechenden Fraktionen. Der Kasten in Bahn 4 zeigt die dem Zielprotein entsprechende Bande (Legende: D+1-4. Durchlauf und Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie; M. Proteinmarker).

Zur Bestätigung wurde ein Western-Blot mit den Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie, sowie der Bakterienkultur zum Ende der Überexpression und der unlöslichen Fraktion nach dem Zellaufschluss durchgeführt (Abb. 6.25). Der verwendete Anti-*His-Tag*-Antikörper band in allen eingesetzten Fraktionen ein Protein auf gleicher Höhe, welches der schon zuvor im Coomassie-gefärbten SDS-Gel zu sehenden Bande entsprach.

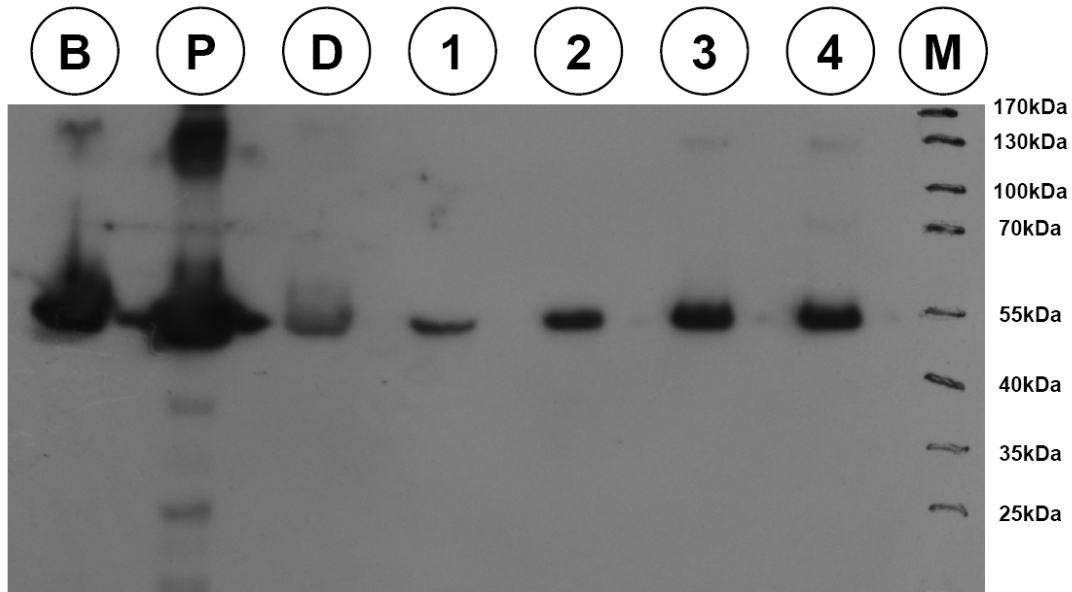


Abb. 6.25: Western-Blot mit Anti-*His-Tag*-Antikörper mit Fraktionen von B32b aus C43 (DE3) (Legende: B. Bakterienkultur am Ende der Überexpression; P. Pellet / unlösliche Fraktion nach Aufschluss; D. Durchlauf der Nickel-Affinitätschromatographie; 1-4. Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie; M. Proteinmarker).

Im Anschluss wurden die Fraktionen 3 und 4 auf ihre Aktivität gegenüber Cortison überprüft. Hierfür wurden neben den Ansätzen mit den Fraktionen 3 und 4 auch eine Positivkontrolle und zwei Negativkontrollen angesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit humanen Lebermikrosomen. Die Negativkontrollen enthielten die für 10 min bei 95°C hitzeinaktivierte Fraktion 4 und entsprechend inaktivierte humane Lebermikrosomen. In Abb. 6.26 ist zu sehen, dass die Fraktionen 3 (cyan) und 4 (schwarz) eine scheinbare Aktivität aufwiesen. Gegenüber der Negativkontrolle mit den inaktivierten Lebermikrosomen ist eine deutliche Abhebung von der Grundlinie auszumachen.

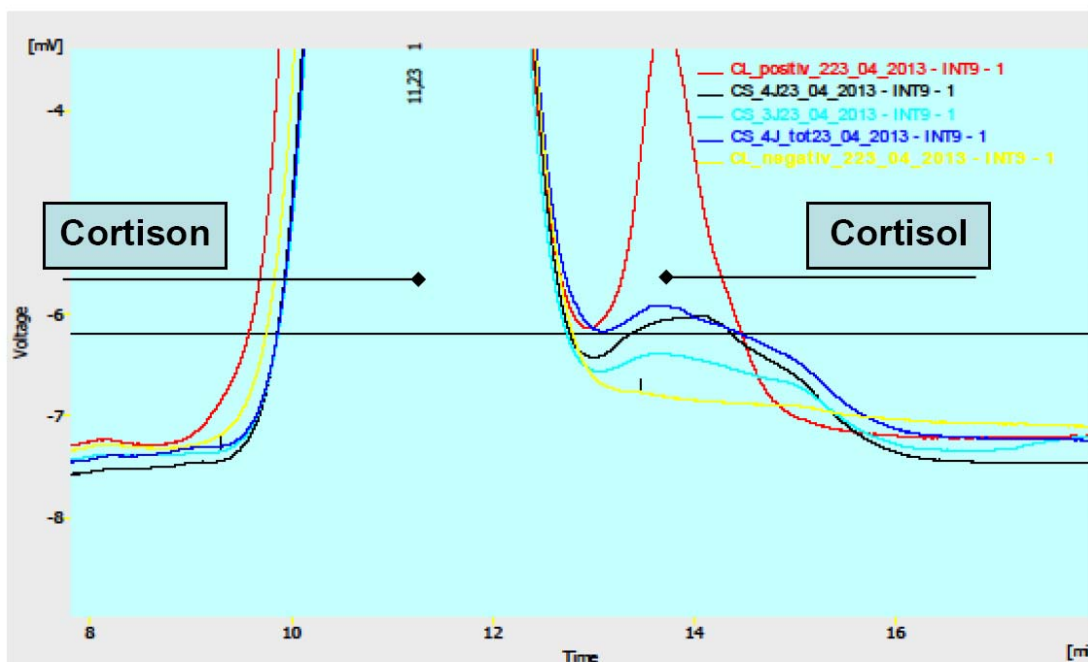


Abb. 6.26: HPLC-Chromatogramm zur Überprüfung der Aktivität von B32b aus C43 (DE3) gegenüber Cortison. Rot: Positivkontrollen (humane Lebermikrosomen); schwarz: Fraktion 4 der Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie; cyan: Fraktion 3 der Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie; blau: Negativkontrolle, hitzeinaktivierte Fraktion 4; gelb: Negativkontrolle, hitzeinaktivierte humane Lebermikrosomen.

Unglücklicherweise war ein entsprechender Verlauf auch beim Ansatz mit der hitzeinaktivierten Fraktion zu beobachten. Eine erneute Überprüfung zeigte, dass auch Ansätze mit den verwendeten Imidazol-Puffern diesen Verlauf zeigten. Ein Umsatz durch das Zielprotein musste somit ausgeschlossen werden.

Auch die Untersuchungen durch Messung der Abnahme der NADPH-Konzentration am Cary 100 Scan Photometer (Liste der Substanzen in Tabelle 18 im Anhang) lieferte keine Hinweise auf mögliche Substrate.

6.4.2.3 Klonierung der 11 β -HSD 3 Transkriptvariante B in pET-43b

Als Template für die Schnittstellen-PCR diente das pET-32b-Plasmid nach Mutagenese (s. o.). Nach erfolgreicher Klonierung und Transformierung in

den Expressionsstamm BL21 (DE3)-R3-pRARE2 zeigten sich im Anschluss an eine Überexpression deutliche Mengen an Zielprotein in der löslichen Fraktion.

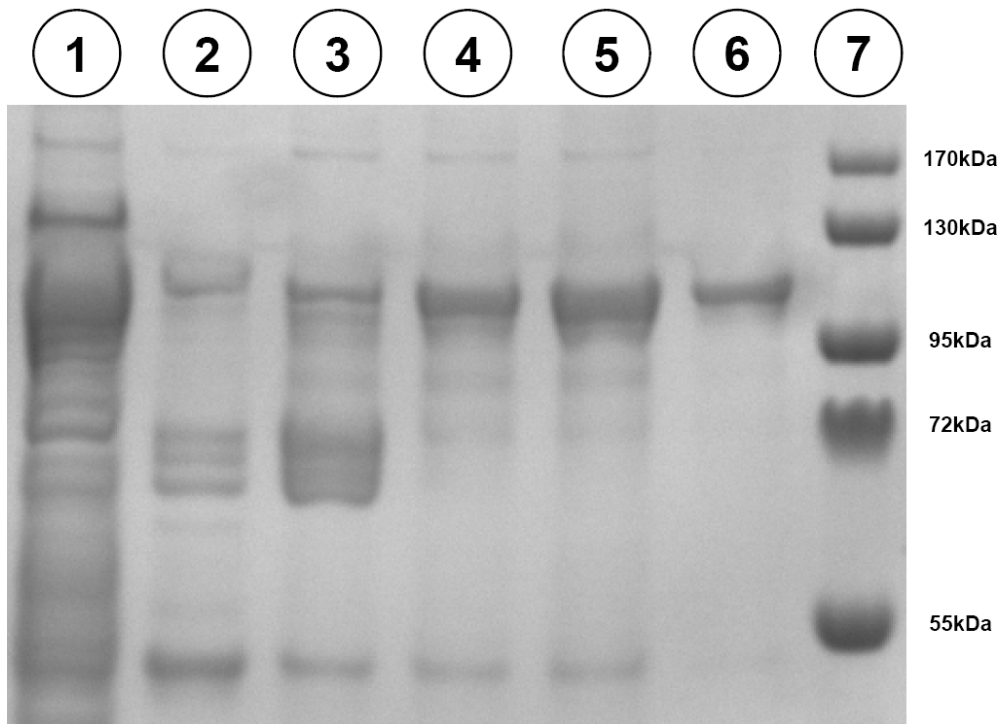


Abb. 6.27: SDS-Gel der Reinigung der Überexpression von B43b in BL21 (DE3)-R3-pRARE2 mittels Nickel-Affinitätschromatographie (Legende: 1. Durchlauf der Nickel-Affinitätschromatographie; 2-6. Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie; 7. Proteinmarker).

Die anschließende Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie lieferte eine Fraktion mit einer einzelnen Bande bei etwa 110 kDa (berechnete molekulare Masse der Transkriptvariante B in pET-43b: 93,0 kDa).

Die gereinigte Fraktion wurde im Anschluss mit Thrombin verdaut. Ein zweiter analoger Ansatz mit für 5 min bei 95°C inkubiertem Thrombin diente der Kontrolle. In Abb. 6.28 ist zu sehen wie über den Zeitraum von 5 h die entsprechende Bande aus der gereinigten Fraktion immer schwächer wurde (Abb. 6.28, oberer Kasten). Im Gegenzug entstand auf Höhe von ca. 40 kDa eine neue Bande die dem Zielprotein (berechnete molekulare Masse 34,1 kDa) entsprach (Abb. 6.28, unterer Kasten).

Ergebnisse

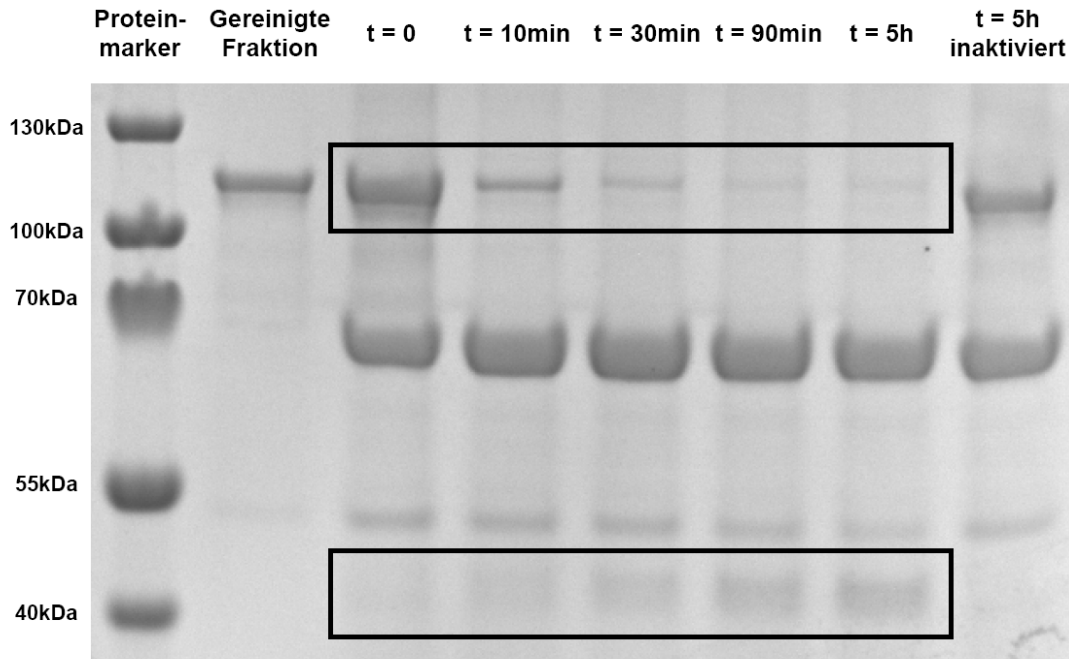


Abb. 6.28: Dokumentation des Thrombinverbaus von B43b mittels SDS-PAGE. Auf der Bahn rechts außen ist der Ansatz mit dem vermeintlich hitzeinaktivierten Thrombin aufgetragen. Oberer Kasten: Abnahme der Ursprungsbande über Zeitraum von fünf Stunden; unterer Kasten: Zunahme einer Bande, die dem abgespaltenen Zielprotein entsprechen könnte.

Die Bande bei knapp unterhalb von 70 kDa ist vermutlich dem abgespaltenen *Nus-Tag* zuzusprechen (berechnetes Molekulargewicht des Fragments 58,9 kDa). Warum diese Bande auch in der Bahn des Ansatzes mit für 5 min bei 95°C hitzeinaktivierten Thrombin erschien bleibt ungeklärt. Eventuell kam es nicht zu einer vollständigen Inaktivierung. Um auszuschließen, dass die Banden auf das verwendete Thrombin zurückzuführen sind, wurde es allein in einer 50-fach höheren Konzentration als in den zuvor verwendeten Ansätzen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Es ließ sich lediglich eine einzelne Bande auf Höhe von etwa 37 kDa ausmachen (nicht abgebildet), was der molekularen Masse des Enzyms genau entspricht.

Auf eine Aufreinigung nach Umpufferung wurde nach den Erfahrungen mit dem verdauten E43b-Konstrukt verzichtet. Untersuchungen zu möglichen Substraten wurden daraufhin mit gereinigtem Fusionsprotein vollzogen. Weder die Untersuchung mittels HPLC, noch die Messung der Abnahme der NADPH-Konzentration am Cary 100 Scan Photometer lieferte Ergebnisse, die darauf schließen lassen, dass eine der Substanzen (Liste der

untersuchten Substanzen siehe Tabelle 18 im Anhang) als Substrat in Frage kommt.

6.5 Klonierung einer homologen 11 β -HSD 1 aus *Caenorhabditis elegans*

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der rekombinanten Herstellung der menschlichen 11 β -HSD 1 und dem hohen Aufwand, der mit der Gewinnung des nativen Enzyms verbunden ist, sollte versucht werden, ein homologes Protein aus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) in einem bakteriellen Expressionssystem überzuexprimieren und aufzureinigen.

6.5.1 Bioinformatische Vorarbeiten

Der Nematode *C. elegans* dient in der Genetik aufgrund seiner einzigartigen Eigenschaften als Modellorganismus. Nachdem Baker bereits nach einem Vorläuferprotein der humanen 11 β -HSD 2 in *C. elegans* gesucht hatte [93], wurde hier überprüft, ob sich ein Homolog zur humanen 11 β -HSD 1 im Proteom des Fadenwurms finden würde.

Eine in der *GenBank*®-Datenbank durchgeführte BLAST-Suche der Sequenz der humanen 11 β -HSD 1 gegen das Proteom von *C. elegans* lieferte als ersten Hit das Protein DHS-30 (NP_510793 für das Protein, NM_078392 für die entsprechende mRNA) mit einer Sequenzidentität von 30%, was für SDRs bereits ein relativ hoher Wert ist [94;95]. Die Enzyme 11 β -HSD Typ 1 und Typ 2 haben beispielsweise weniger als 25% Sequenzidentität [69].

Die 311 Aminosäuren lange Proteinsequenz von DHS-30 zeigt neben der N-terminalen Kofaktor-Bindedomäne mit dem Motiv „GxxxGxG“ auch die für klassische SDRs typische katalytische Triade bestehend aus den Aminosäuren Tyrosin, Lysin und Serin (abgekürzt mit Y, K und S; siehe Kasten in Abb. 6.29) [96;97].

Ergebnisse

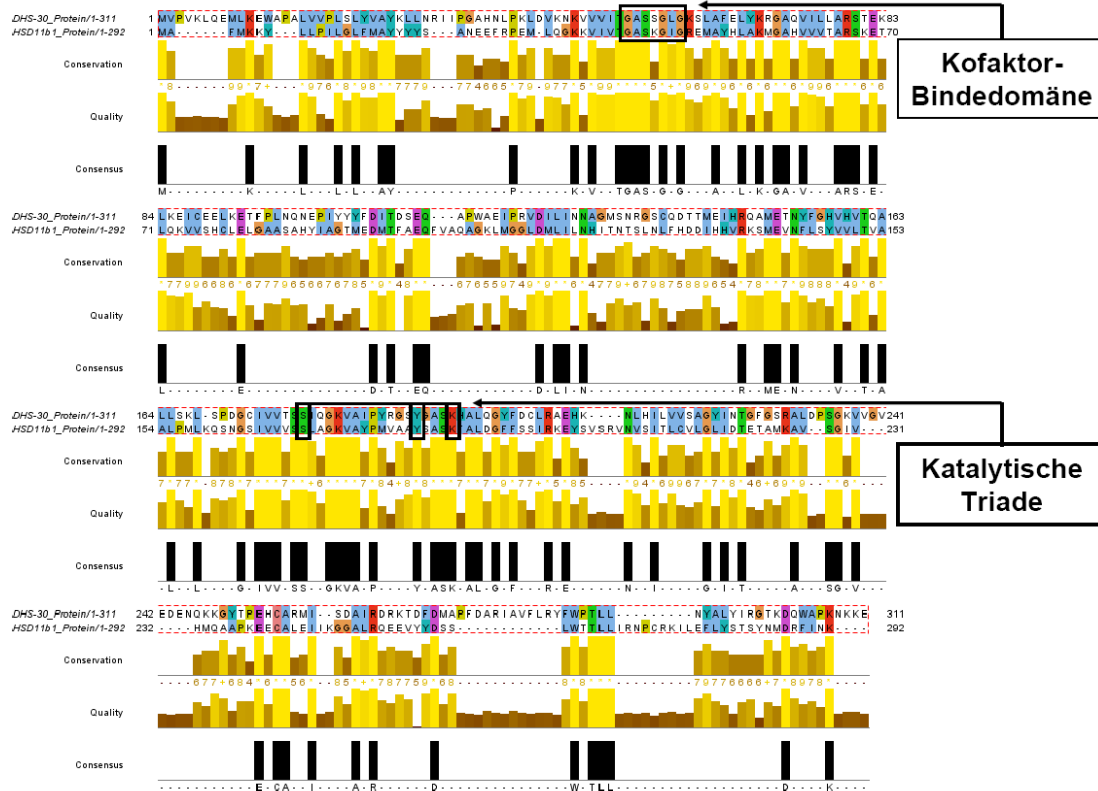


Abb. 6.29: Sequenzalignment von DHS-30 aus *C. elegans* und der humanen 11β-HSD 1. Im oberen Teil ist die Kofaktor-Bindedomäne mit dem Motiv „GxxxGxG“ eingerahmt. Im mittleren Teil sind die drei konservierten Aminosäuren Serin (S), Tyrosin (Y) und Lysin (K) hervorgehoben, die zusammen die katalytische Triade bilden.

Da DHS-30 trotz relativ hoher Sequenzidentität zur humanen 11β-HSD 1 und Anwesenheit von Kofaktor-Bindedomäne und katalytischer Triade durch das SDR-Klassifikationssystem keiner bekannten SDR-Proteinfamilie zugeordnet werden konnte^w [19;22], lag die Vermutung nahe, dass dieses Enzym ein frühes Vorläuferprotein der humanen 11β-HSD 1 sein könnte.

6.5.2 Klonierung einer homologen 11β-HSD 1 aus *C. elegans*

Als Template für die Schnittstellen-PCRs diente eine *C. elegans*-cDNA-Bank^x. Verwendet wurden die Primer #998 und #999. Das erhaltene Insert

^w <http://www.sdr-enzymes.org/papers.htm>

^x Dankend erhalten von Prof. Dr. Roeder, Zoologisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Ergebnisse

wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* verdaut, aufgereinigt und in den Vektor pET-43b kloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde das Plasmid in den Expressionsstamm Origami (DE3) transformiert. Die Überexpression lieferte ein Protein (berechnete molekulare Masse 97,1 kDa), welches sich nach dem Aufschluss auch in der löslichen Fraktion finden ließ (Abb. 6.30).

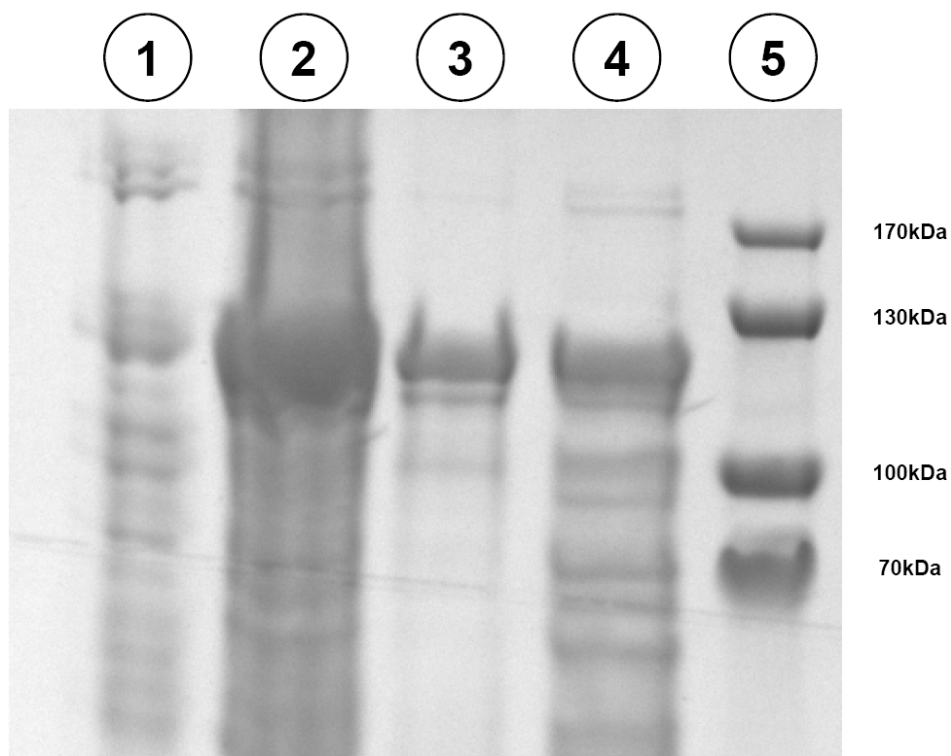


Abb. 6.30: Dokumentation der Überexpression von *Nus-Tag*-gebundenem DHS-30 in Origami (DE3) (Legende: 1. Bakterienkultur vor Induktion mit IPTG; 2. Bakterienkultur am Ende der Überexpression; 3. unlösliche Fraktion nach Aufschluss; 4. Überstand nach Aufschluss; 5. Proteinmarker).

Die anschließende Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie lieferte eine nahezu reine Bande (Abb. 6.31).

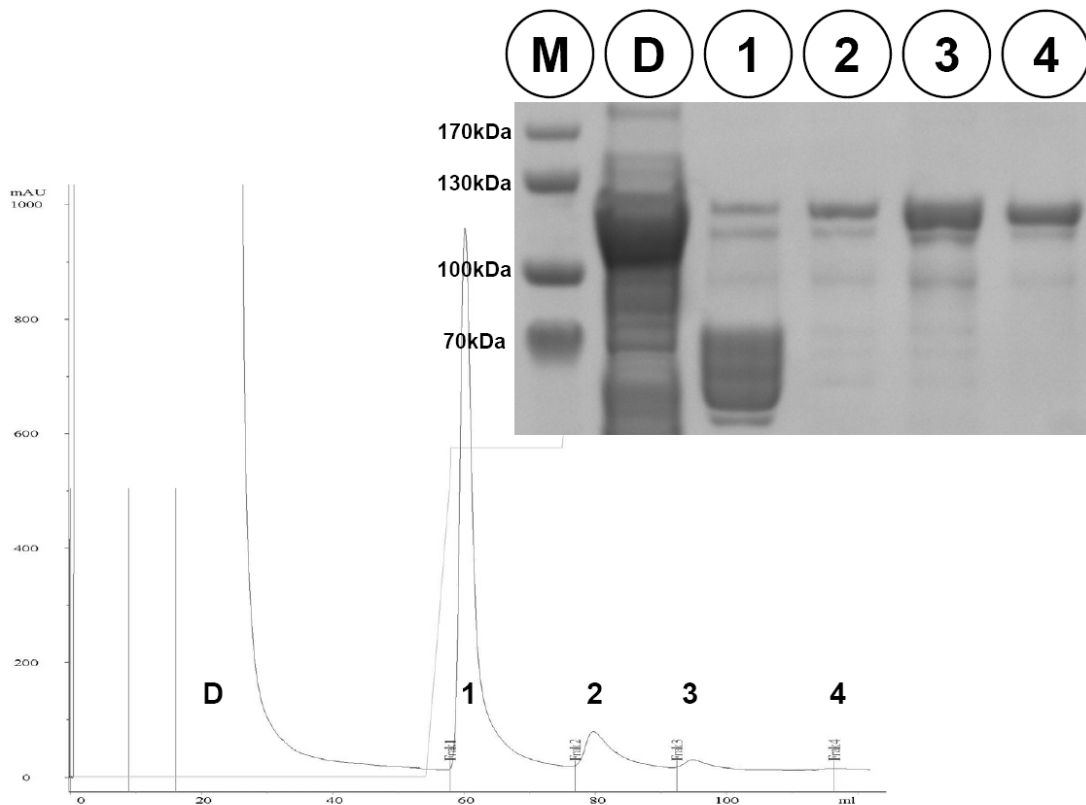


Abb. 6.31: Gezeigt ist das Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie der Überexpression von DHS-30 in Origami (DE3) und das SDS-Gel der entsprechenden Fraktionen (Legende: M. Proteinmarker; D+1-4. Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie).

Analog zu den *Nus-Tag*-gebundenen 11 β -HSD 3-Proteinen wurde auch hier versucht, den *Nus-Tag* mit Hilfe von Thrombin abzuspalten. Es wurde 42 h bei RT inkubiert. Ein SDS-Gel mit dem verdauten Ansatz zeigte neben einer Bande von noch unverdautem Fusionsprotein auch zwei weitere Banden, die den Fragmenten des *Nus-Tags* (berechnete molekulare Masse von 58,9 kDa) und des abgespaltene Zielproteins (berechnete molekulare Masse von 38,1 kDa) zugeordnet werden könnten (siehe Abb. 6.32).

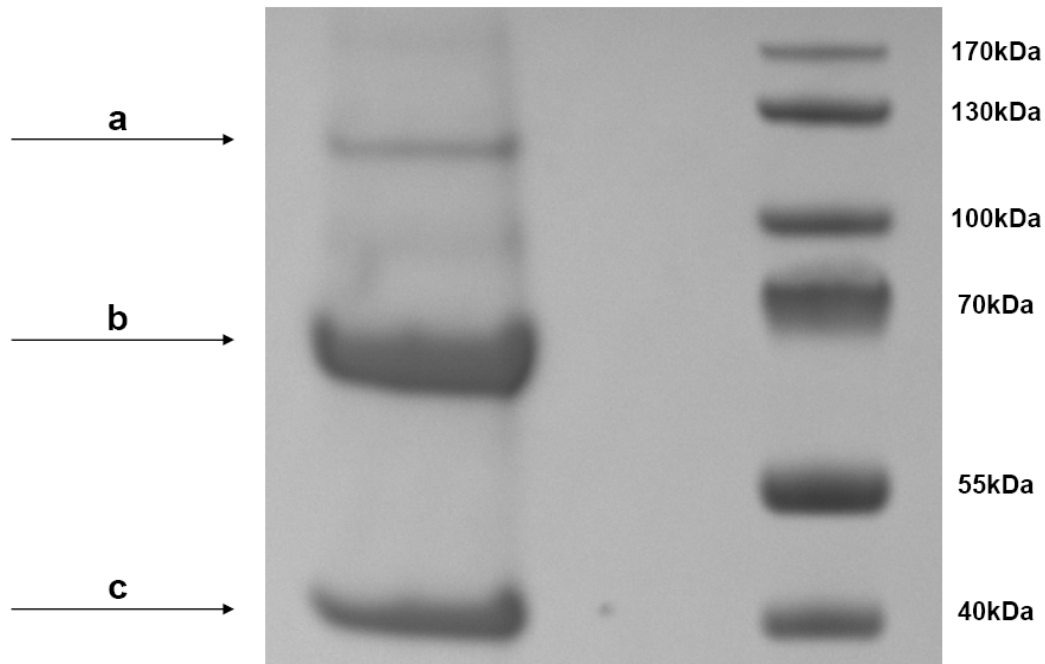


Abb. 6.32: SDS-Gel des für 42 h mit Thrombin verdauten *Nus-Tag*-gebundenen Proteins DHS-30; a.) unverdautes Protein; b.) abgespaltener *Nus-Tag* (berechnetes Molekulargewicht 58,9 kDa; c.) abgespaltenes Zielprotein (berechnetes Molekulargewicht 38,1 kDa).

Im Anschluss wurde umgepuffert, um störende Mengen von Imidazol zu entfernen und somit das Zielprotein durch Nickel-Affinitätschromatographie aufzureinigen zu können. Keine der aufgefangenen Fraktionen zeigte auf einem SDS-Gel eine mögliche Bande des Zielproteins. Es fand sich lediglich eine Bande zwischen 55 und 70 kDa, die dem abgespaltenen *Nus-Tag* zugeordnet wurde. Es ist zu vermuten, dass das abgespaltene Zielprotein während der Umpufferung ausgefallen und an der Membran adsorbiert war.

Entsprechend den Transkriptvarianten von 11 β -HSD 3 wurden Substratuntersuchungen daraufhin mit dem *Nus-Tag*-gebundenen Protein vollzogen. Die Substanzen Cortisol/Cortison, Metyrapon und Oracin wurden mittels HPLC überprüft. Es ließ sich kein Umsatz feststellen. Die restlichen Substanzen (siehe Liste im Anhang Tabelle 18) wurden mit dem Cary 100 Scan Photometer auf NADPH-Abnahme überprüft. Auch hier zeigte sich kein Umsatz.

7 Diskussion und Ausblick

7.1 Untersuchungen zur Regulation der Enzyme 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2

Trotz des Wissens um die Bedeutung der Enzyme 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2 als „Cortison-Cortisol-Shuttle“ [11;12], und der Beteiligung der Enzyme im Entzündungsgeschehen [9;10;15;98] ist über die Regulation der Enzyme noch immer nicht alles bekannt. Es sollte deshalb untersucht werden, wie sich die Expressionslevel von 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2 in entzündetem Gewebe von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) von denen in nicht-entzündetem Gewebe unterscheiden. Von besonderem Interesse war dabei, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausprägung der Regulation gäbe.

Des Weiteren sollte versucht werden, die Rolle der zwei Promotoren im *HSD11B1*-Gen aufzuklären. Nach Etablierung eines Real-Time-PCR-Assays für die unterschiedlichen Transkriptvarianten sollte dafür ein geeignetes Zellmodell gefunden werden, um die Promotoren zu untersuchen.

7.1.1 Untersuchung von Biopsiematerial von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

In den Untersuchungen ließ sich nachweisen, dass in entzündetem Biopsiegewebe von Patienten mit Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) die Transkriptlevel von 11 β -HSD 1 signifikant erhöht waren gegenüber Gewebe aus nicht-entzündeten Darmsegmenten. Bei Patienten mit MC waren die Transkriptlevel um den Faktor 2,72, bei Patienten mit CU um den Faktor 3,82 erhöht. Begleitet wurde die Regulation durch ebenfalls veränderte Transkriptlevel von 11 β -HSD 2. Diese waren bei Patienten mit MC um den Faktor 1,86, bei Patienten mit CU um den Faktor 2,29 erniedrigt. Es konnte somit gezeigt werden, dass in entzündetem Colon-Gewebe von CED-Patienten nicht nur das Glucocorticoid-aktivierende Enzym 11 β -HSD 1

hochreguliert war, sondern gleichzeitig 11 β -HSD 2, welches Glucocorticoide deaktiviert, herunterreguliert war. Dabei waren die beobachteten Unterschiede der Expressionslevel für beide Enzyme im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant. Ein derartig verändertes Expressionsprofil ermöglicht einen entsprechenden Effekt auf Proteinebene. Die veränderte Verfügbarkeit der Enzyme 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2 kann dann zu einer Veränderung des Verhältnisses zwischen inaktivem und aktivem Glucocorticoid führen. Als Folge steht ein höherer Spiegel an Cortisol zur Verfügung, welches dann im Zielgewebe seine anti-inflammatorische Wirkung entfalten kann und so der Entzündung entgegen wirkt.

Die Erhöhung der lokalen Glucocorticoid-Konzentration durch erhöhte 11 β -HSD 1-Expression als Antwort auf pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) spielt eine wichtige Rolle bei der Immunregulation in unterschiedlichen Zelltypen [99-102]. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass die Hochregulation von Cortisol-aktivierender 11 β -HSD 1 in vielen Fällen, jedoch nicht immer, von einer verminderten Expression von Cortisol-deaktivierender 11 β -HSD 2 begleitet wurde [103;104].

Nuklearfaktor- κ B (NF- κ B), ein zentraler Vermittler der humanen Immunantwort, ist an der transkriptionellen Kontrolle von Genen beteiligt, die sowohl im Entzündungsgeschehen als auch bei der zellulären Differenzierung, Proliferation und Apoptose eine Rolle spielen [105]. Transkriptionelle Aktivierung von NF- κ B führt zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β . Diese binden an ihre Rezeptoren, wodurch sie ihre eigenen Gene induzieren und das pro-inflammatorische Signal verstärken. Als Folge kommt es zu einem Anstieg der Expression von 11 β -HSD 1 und einer Versorgung des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) mit seinem endogenen Liganden Cortisol [102] (siehe Abb. 7.1). Nach Bindung des Liganden wandert der aktivierte GR in den Zellkern und vermittelt dort seine anti-inflammatorische Wirkung durch die Repression von NF- κ B-regulierten Genen [5-7].

Die oben beschriebenen Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Zbáňková *et al.* [106]. Entzündetes Colon-Gewebe von Patienten mit CU

daher anzunehmen, dass die beschriebenen Beobachtungen von Takahashi *et al.* nicht auf den geringeren Gehalt an Epithelzellen in den untersuchten Proben zurückzuführen sind.

Interessanterweise stellte sich der hochregulierende Effekt bei 11 β -HSD 1 bei männlichen Patienten als deutlich ausgeprägter heraus. Bei Patienten mit MC waren die Transkriptlevel von weiblichen Patienten um den Faktor 1,81 erhöht, bei männlichen um den Faktor 4,83. Noch ausgeprägter war der Unterschied bei den Patienten mit CU. Die Transkriptlevel von weiblichen Patienten waren in entzündetem Gewebe gegenüber nicht-entzündeten Bereichen um den Faktor 1,84 erhöht. Bei den männlichen Patienten betrug der Faktor jedoch 6,51.

Ursächlich für die geringere Hochregulation des 11 β -HSD 1-Gens bei weiblichen Patienten könnte ein höherer Level an zirkulierenden anti-inflammatorisch wirkenden Estrogenen sein. Da bekannt ist, dass Estradiol durch die Inhibierung von NF- κ B immunmodulatorische Eigenschaften hat [108], könnten zirkulierende Level dieses Steroidhormons einen Effekt auf die Entzündungsantwort in entzündetem Gewebe von CED-Patienten haben. Zusammen mit der Transrepression von NF- κ B durch den Liganden-gebundenen Estrogenrezeptor wird der anti-inflammatorische Effekt von Estradiol durch die Repression des TNF- α -Gens vermittelt [109]. Die Vermutung, dass Estrogene eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Manifestation von CED haben könnten, wird durch Untersuchungen von Harris *et al.* gestützt [110]. In einem CED-Tiermodell konnten durch Aktivierung des Estrogenrezeptors β Entzündungsreaktionen gemildert werden.

Nachdem die Erkenntnisse der regulativen Effekte während einer Entzündungsreaktion mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen bestätigt und insbesondere um die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Ausprägung der Regulation der Enzyme ergänzt wurden, stellte sich die Frage nach den Rollen der zwei Promotoren des *HSD11B1*-Gens. Denkbar wäre, dass einer der Promotoren für die basale Expression des Proteins verantwortlich wäre und der andere eine zusätzliche, eventuell kurzfristige Expression, z. B. in einer Entzündungsreaktion, vermittelt. Aus diesem Grund

sollte versucht werden, Real-Time-PCR-Assays zu konzipieren, um die aus den unterschiedlichen Promotoren resultierenden Transkriptvarianten quantifizieren zu können.

7.1.2 Entwicklung von Real-Time-PCR-Assays für die Transkriptvarianten P1 und P2 der 11 β -HSD 1

Es konnten Real-Time-PCR-Assays bestehend aus Primerpaaren und Sonden entwickelt werden, die die zwei Transkriptvarianten P1 (entsprechend Transkriptvariante 2 in der *GenBank*®-Datenbank, NM_181755) und P2 (entsprechend Transkriptvariante 1 in der *GenBank*®-Datenbank, NM_005525) von 11 β -HSD 1 detektieren können. Bei Messungen mit Standardreihen von Zielsequenz-tragenden Plasmiden zeigten die Assays Spezifität, d.h. sie detektierten jeweils nicht die andere Transkriptvariante. Desweiteren konnten die Effizienzen mit 1,15 für den Assay P1 und 1,12 für den Assay P2 bestimmt werden (siehe 6.2.1), was im Bereich kommerziell erwerblichen Assays, wie z. B. den TaqMan® Assays von Life Technologies ($1,00 \pm 0,1$) liegt.

Nach Abschluss und Veröffentlichung der Ergebnisse zu den kreierten Real-Time-PCR-Assays führte die *GenBank*®-Datenbank eine dritte Transkriptvariante des Proteins (NM_001206741). Sie unterscheidet sich in ihrer Sequenz zur Transkriptvariante P1 nur durch einen Einschub von 22 Basen. Ihre Transkription verläuft ebenfalls über den ersten Promotor. Der Einschub entspricht jedoch dem Teil der Sequenz aus Transkriptvariante P2 an dem die Sonde P2 des Assays bindet, was zur Folge hat, dass diese neue Transkriptvariante den 5'-Primer des Assays P1 jedoch beide Sonden bindet (Abb. 7.2).

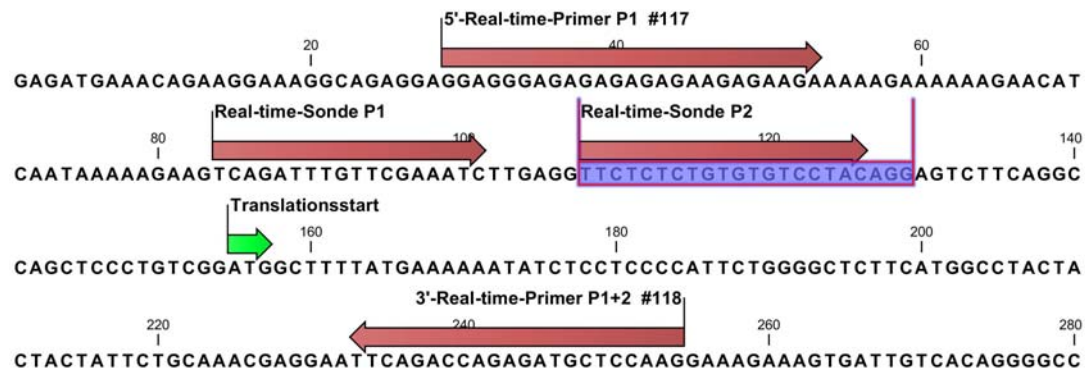


Abb. 7.2: Abgebildet sind die ersten 280 Basen der dritten Transkriptvariante der 11 β -HSD 1. Mit den roten Pfeilen sind die bindenden Oligonukleotide der Real-Time-PCR-Assays dargestellt. Blau unterlegt ist der Unterschied zur Transkriptvariante P1, die diesen DNA-Abschnitt nicht beinhaltet. Der grüne Pfeil zeigt den Translationsstart an.

Als Resultat werden bei der Amplifikation der dritten Transkriptvariante beide Sonden abgebaut und die entstehende Fluoreszenz beider Sonden gemessen, was die Ergebnisse für die Transkriptvarianten P1 und P2 verfälscht.

Für die genaue Quantifizierung von jetzt drei unterschiedlichen Transkripten bedarf es demzufolge einer erneuten Etablierung von Real-Time-PCR-Assays. Hierfür wären dann drei Sonden notwendig, die jeweils nur eine der drei Transkriptvarianten binden. Ein Alignment der drei Transkriptvarianten ist in Abb. 7.3 zu sehen. Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die mRNA-Sequenzen lediglich im untranslatierten Bereich des 5'-Endes (5'-UTR). Eine schematische Darstellung der möglichen Platzierung neuer Real-Time-PCR-Sonden findet sich in Abb. 7.4.

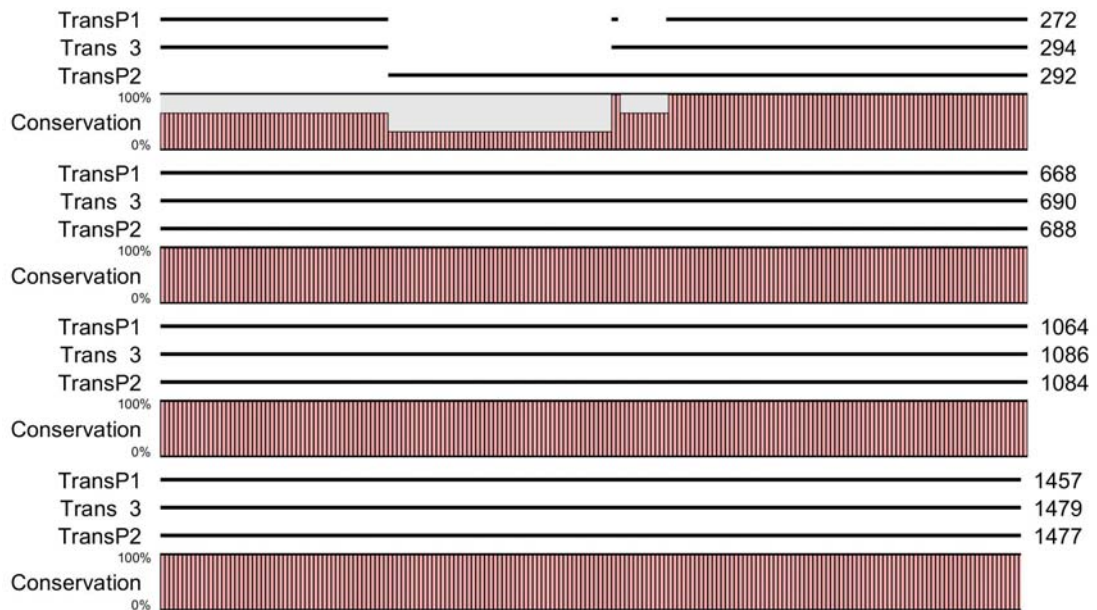


Abb. 7.3: Alignment der Transkriptvarianten P1 und P2 und der dritten Transkriptvariante der 11 β -HSD 1.

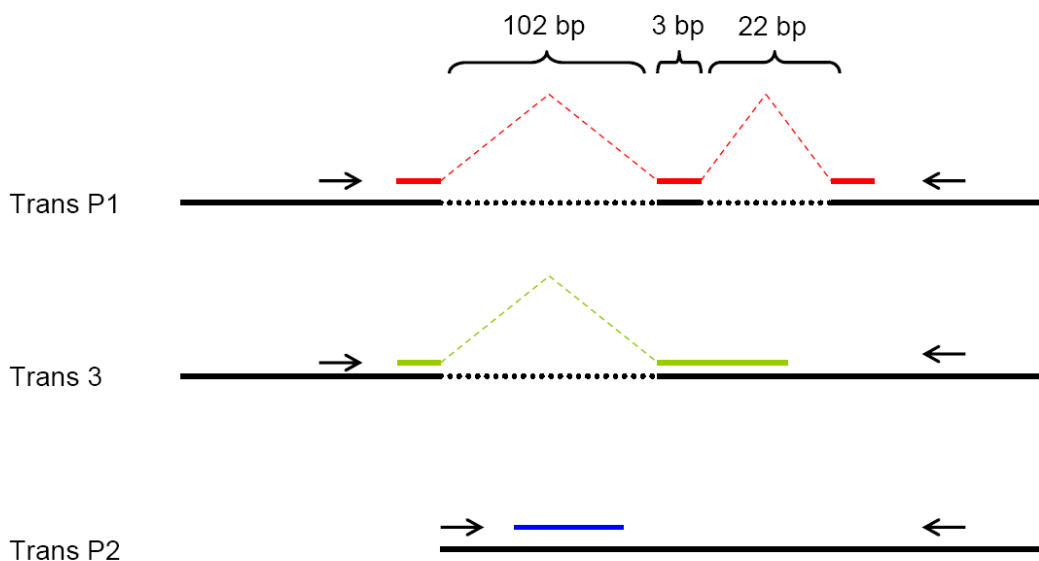


Abb. 7.4: Schematische Übersicht der möglichen neuen Real-Time-PCR-Assays zur Quantifizierung der drei Transkriptvarianten der 11 β -HSD 1. Gezeigt sind die sich unterscheidenden 5'-Enden. Die schwarzen Pfeile stellen die Primer für die Assays dar. Die drei unterschiedlichen Sonden sind farblich hervorgehoben.

Die Untersuchungen mit den bereits designten Assays lieferten dennoch verwertbare Ergebnisse. Bei der untersuchten Leber-cDNA und den Fettgewebepben ließ sich lediglich das P2-Transkript nachweisen. Da es sich bei den Proben mit Leber, Lunge und Fettgewebe um Gewebetypen

handelt, die typischerweise viel 11 β -HSD 1 exprimieren, lässt sich die Vermutung anstellen, dass der Promotor 2 mit einer dauerhaft erhöhten Expression des Enzyms in Verbindung zu bringen ist. Möglicherweise käme dem Promotor 1 infolge dessen die Aufgabe zu, kurzfristig veränderte Expressionen zu vermitteln.

Zur Überprüfung der Hypothese bedürfte es weiterer Untersuchungen von typischen Glucocorticoid-Zielgeweben. Zusätzlich würden sich Untersuchungen von Proben anbieten, bei denen 11 β -HSD 1, z. B. durch eine Entzündung, hochreguliert ist. Auf diese Weise könnte überprüft werden, ob sich das Verhältnis der unterschiedlichen Transkriptvarianten eventuell durch zusätzliche Transkription über den Promotor 1 gegenüber Kontrollproben ändert.

Idealerweise ließen sich hierfür Zelllinien als *in-vitro*-Modell nutzen, indem man die Zellen unterschiedlichen Entzündungs-Stimuli aussetzt. Untersuchungen von diversen Tumorzelllinien ergaben jedoch durchweg sehr niedrige Transkriptionslevel von 11 β -HSD 1, was die Frage aufwarf, ob epigenetische Faktoren wie z. B. Promotor-Hypermethylierung ursächlich dafür sein könnten. Zur Beantwortung der Frage wurden die Zelllinien A431 und HT-29 mit dem Demethylierungsreagenz 5-Azacytidin behandelt, um zu überprüfen, ob die Behandlung zu einer Hochregulation des *HSD11B1*-Gens führt.

7.1.3 Genexpressionsstudie: Zellversuche mit 5-Azacytidin

Bei den Untersuchungen der Zelllinien A431 und HT-29 mittels quantitativer Real-Time-RT-PCR konnte gezeigt werden, dass es nach Behandlung mit 5-Azacytidin zu einer erhöhten Transkription von 11 β -HSD 1 kam. Bei A431-Zellen kam es zu einer Hochregulation um den Faktor 6,17, bei HT-29-Zellen um den Faktor 18,5. Begleitet wurden die Ergebnisse von geringen Änderungen in der Transkription von 11 β -HSD 2 (Faktor 1,68 für A431-Zellen, bzw. 0,83 für HT-29-Zellen).

Als mögliche Ursache für die erhöhte Transkription von 11 β -HSD 1 wurde aufgrund des Fehlens von CpG-Inseln im *HSD11B1*-Gen eine erhöhte

Expression des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) und somit eine indirekte Hochregulation angenommen. Tatsächlich konnte durch die Behandlung mit 5-Azacytidin eine deutliche Erhöhung der GR-Transkription in HT-29-Zellen festgestellt werden. In den entsprechenden Kontrollen der gleichen Zelllinie waren nahezu keine Transkripte nachweisbar. Die Transkription in A431-Zellen blieb durch die Behandlung unbeeinflusst.

Die Untersuchungen der CpG-Insel im Gen des Glucocorticoid-Rezeptors mittels Pyrosequenzierung lieferten aufgrund geringer Intensitäten und hoher Standardabweichungen in den Mehrfachbestimmungen keine verwertbaren Ergebnisse bezüglich einer Änderung des Methylierungsgrads nach Behandlung mit 5-Azacytidin. Es ließ sich jedoch anhand der durchschnittlichen Methylierungsgrade über alle Proben der jeweiligen Zelllinien von 36,5% für HT-29 gegenüber 7,5% für A431 eine mögliche Ursache für die insgesamt deutlich niedrigeren Transkriptlevel von HT-29-Zellen gegenüber den A431-Zellen finden.

Mit der erhöhten Transkription des Glucocorticoid-Rezeptors durch die Behandlung mit 5-Azacytidin ließ sich somit nur für die Zelllinie HT-29 eine mögliche Ursache für die Hochregulation von 11 β -HSD 1 finden. Offen bleibt hingegen die Ursache für den gleichen Effekt in A431-Zellen.

Grundlage der Überlegungen und der angestellten Versuche war die Annahme, dass Methylierung bzw. Demethylierung lediglich einen Effekt auf die Transkription eines Gens haben können, wenn entsprechend ausgeprägte Bereiche, also CpG-Inseln, in der Promotorregion des Gens zu finden sind. Es finden sich jedoch vermehrt Publikationen, in denen die Genexpression vom Methylierungsgrad einzelner bzw. weniger CpG-Dinukleotide beeinflusst wird [111-113]. Auch Inder *et al.* haben sich in ihrer kürzlich erschienenen Veröffentlichung entgegen dieser Annahme auf einzelne CpG-Dinukleotide in den Promotorbereichen des *HSD11B1*-Gens konzentriert [114]. Bei Untersuchungen der Skelettmuskulatur von Patienten mit Typ 2-Diabetes konnte nach Gabe von Dexamethason eine Hochregulation nachgewiesen werden. Die verringerte Methylierung eines einzelnen CpG-Dinukleotids in der Region des distalen Promotors 1 wurde mit der erhöhten Transkription in Verbindung gebracht. Das betreffende

Dinukleotid befindet sich direkt angrenzend an eine Glucocorticoid-Bindestelle (GRE: glucocorticoid response element) (siehe Abb. 7.5) und könnte somit die Zugänglichkeit des DNA-Abschnitts für den aktivierten Glucocorticoid-Rezeptor beeinflussen.

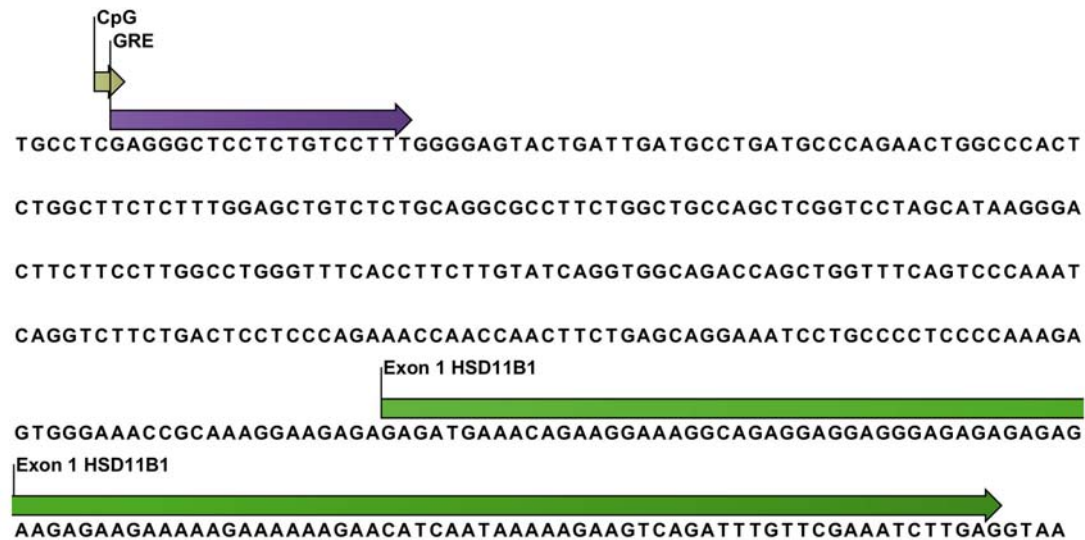


Abb. 7.5: Ausschnitt aus dem distalen Promotorbereich des *HSD11B1*-Gens vor dem ersten Exon. Zu sehen ist das CpG-Dinukleotid, welches unmittelbar an die Glucocorticoid-Bindestelle (GRE: glucocorticoid response element) angrenzt.

Somit käme doch eine direkte Wirkung der durch 5-Azacytidin erzeugten Demethylierung auf den Transkriptlevel von 11 β -HSD 1 infrage.

Zukünftige Untersuchungen sollten den Methylierungsgrad dieses CpG-Dinukleotids vor und nach Behandlung mit 5-Azacytidin beinhalten. Zudem könnte nach Etablierung eines neuen Real-Time-PCR-Assays überprüft werden, ob die Behandlung Einfluss auf das Verhältnis der unterschiedlichen Transkriptvarianten hat.

Die Untersuchung mittels Western-Blot hat gezeigt, dass sich die Proteinmenge von 11 β -HSD 1 in den Zelllinien A431 und HT-29 durch die Behandlung mit 5-Azacytidin trotz erhöhter Transkription nicht geändert hat. Neben anderen Faktoren der posttranskriptionellen Genregulation kämen hierfür microRNAs als Ursache infrage. Mittels Array-basierter microRNA-Expressionsuntersuchung ließe sich überprüfen, ob es durch die Behandlung mit 5-Azacytidin auch hier zu erhöhten Transkriptionen kommt.

7.2 Klonierung und Charakterisierung der 11 β -HSD 3 und einer homologen 11 β -HSD 1 aus *Caenorhabditis elegans*

7.2.1 Klonierung der 11 β -HSD 3

Für die 11 β -HSD 3, dessen Existenz erst verhältnismäßig kurz bekannt ist, konnte eine interessante gewebsspezifische Expression gezeigt werden [66]. Zusammen mit der unidirektionalen Aktivität als Hydroxysteroid-Dehydrogenase bei zeitgleicher niedriger Expression der 11 β -HSD 2, ließ sich die Vermutung anstellen, dass dem Enzym durch Desaktivierung von Glucocorticoiden eine gewisse Schutzfunktion im Gehirn zukommen könnte. Evolutionäre Betrachtungen lassen jedoch den Schluß zu, dass das Enzym ursprünglich für die Metabolisierung anderer Substrate verantwortlich war [70] und eventuell noch heute zusätzliche Substrate besitzt.

Da das Enzym bislang noch völlig unzureichend biochemisch charakterisiert ist, sollte durch rekombinante Herstellung und Aufreinigung zweier Transkriptvarianten die Aufklärung der Rolle der 11 β -HSD 3 weiter vorangetrieben werden.

7.2.1.1 Klonierung der Transkriptvariante E

Die kodierende Sequenz der Transkriptvariante E der 11 β -HSD 3 wurde zunächst in den Vektor pET-15b kloniert. Der Vektor vermittelt dem Protein lediglich einen sogenannten *His-Tag*, der die Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie ermöglicht. Es konnte jedoch trotz erfolgreicher Sequenzierung des Plasmids und Nutzung unterschiedlicher Bakterienstämme keine Überexpression mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden. Ursächlich könnte eine toxische Wirkung des Proteins auf die verwendeten Bakterienstämme sein. In zukünftigen Arbeiten könnte versucht werden, eine Überexpression mit der Hefe *Pichia pastoris* bzw. einem zellfreien Expressionssystem durchzuführen.

Mit Hilfe der Vektoren pET-32b und pET-42b gelangen dann zwar erfolgreiche Überexpressionen, wie sich mittels SDS-PAGE zeigen ließ. Jedoch waren die Löslichkeits-vermittelnden Proteine *Trx-Tag* und *GST-Tag*

auch bei Verwendung unterschiedlicher Bakterienstämme nicht in der Lage, die Löslichkeit des Fusionsproteins derart zu erhöhen, dass sich ausreichende Mengen davon in der löslichen Phase finden ließen. Eine Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie wurde aus diesem Grund nicht versucht. Auch hier könnte versucht werden, die Löslichkeit mit einem alternativen Expressionssystem oder der Verwendung eines geeigneten Detergens zu erhöhen.

Abschließend gelang es, die Transkriptvariante E mit Hilfe des sogenannten *Nus-Tags*, in ausreichendem Maße nach Überexpression im Bakterienstamm BL21 (DE3)-R3-pRARE2 in die lösliche Fraktion zu bringen und aufzureinigen. Hierfür wurde der Vektor pET-43b verwendet. Das Testen von 49 Carbonylverbindungen als potentielle Substrate lieferte jedoch keinerlei Hinweis auf eine mögliche Umsetzung. Die Größe des *Nus-Tags* von 61,1 kDa birgt eventuell die Gefahr das eigentliche Zielprotein zu inaktivieren, indem Substraten oder Kofaktoren der Zugang zu den Binderegionen verwehrt wird. Zur Abspaltung des *Nus-Tags* wurde das aufgereinigte Fusionsprotein mit Thrombin verdaut. Der Erfolg des Verdaus ließ sich auch mittels SDS-PAGE belegen. Nach Umpuffern ließ sich jedoch kein Zielprotein mehr nachweisen. Die Vermutung liegt nahe, dass es während des Vorgangs ausgefallen ist.

7.2.1.2 Klonierung der Transkriptvariante B

Analog zur Transkriptvariante E konnte auch die Transkriptvariante B trotz erfolgreicher Sequenzierung des Plasmids und Verwendung unterschiedlicher Bakterienstämme nicht mit Hilfe des Vektors pET-15b überexprimiert werden. Auch hier bieten sich alternative Expressionssysteme für zukünftige Arbeiten an.

Nach Versuchen mit unterschiedlichen Bakterienstämmen gelang schließlich eine Überexpression mit anschließender Aufreinigung der Transkriptvariante B mit Hilfe des Vektors pET-32b im Bakterienstamm C43 (DE3). Es konnte jedoch weder eine enzymkatalysierte Reduktion von Cortison noch eine Oxidation von Cortisol nachgewiesen werden. Huang *et al.* konnten eine Umsetzung von Cortisol mit dieser Transkriptvariante über die indirekte Messung der Abnahme der NADP⁺-

Konzentration nachweisen [66]. Für das Ausbleiben der Umsetzung mit dem hier hergestellten Protein kommen unterschiedliche Gründe in Betracht.

Es besteht immer die Möglichkeit, dass die Aktivität eines Enzyms während des Zellaufschlusses und der sich anschließenden Reinigung verloren geht. Die während dieser Arbeit verwendeten Methoden unterschieden sich von den von Huang *et al.* publizierten lediglich beim Zellaufschluss. Der hier verwendete Aufschluss mittels French Press vermeidet im Gegensatz zu einer Behandlung mit Ultraschall eine Entwicklung von Hitze, was ihn zur schonenderen Methode macht. Es ist deshalb nicht davon auszugehen, dass die Art der Aufarbeitung für ein Ausbleiben von messbarer Aktivität verantwortlich ist.

Die von Huang *et al.* durchgeführte Messung der Abnahme der NADP⁺-Konzentration zur Überprüfung der Aktivität der 11 β -HSD 3 gegenüber Cortisol konnte letztlich nur eine Umsetzung des Kofaktors bestätigen [66]. Eine sichere Auskunft über das entstehende Produkt liefert diese Art der Messung nicht. Denkbar und durch die Untersuchungen von Huang *et al.* nicht ausgeschlossen wäre also auch eine Umsetzung von Cortisol an einer anderen Stelle des Moleküls und somit einem anderen Produkt als Cortison. Die während dieser Arbeit durchgeführte Überprüfung einer möglichen Umsetzung mittels HPLC und UV-Detektor unterschied Cortisol und Cortison anhand der Retentionszeiten. Im Chromatogramm wurden nur Substrat und Produkt detektiert. Da jedoch die Messung von Cortisol und Cortison kein Signal eines möglichen anderen Produkts lieferte, ist es unwahrscheinlich, dass es zu einer Umsetzung der Substanzen kam.

Als weitere denkbare Möglichkeit für das Ausbleiben von Aktivität kommt die Verwendung geringfügig unterschiedlicher Vektoren infrage. Der von Huang *et al.* verwendete Vektor pET-32a unterscheidet sich von pET-32b um ein zusätzliches Thymin zwischen den Erkennungssequenzen von *NcoI* und *EcoRV*. Zur Vermeidung eines Frameshifts wurde in dieser Arbeit über den verwendeten 5'-Primer #226 ein Guanin hinter die Erkennungssequenz von *EcoRI* eingefügt, wodurch es lediglich zu einer begrenzten Verschiebung des Lesereasters kam. Dadurch unterscheiden sich die erhaltenen Proteine im

Bereich zwischen Fusions- und Zielprotein um sechs Aminosäuren (siehe Abb. 7.6).

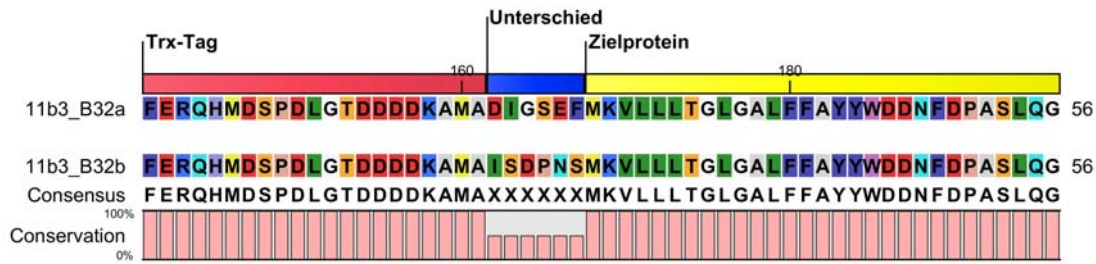


Abb. 7.6: Ausschnitt des Alignments der in den Vektoren pET-32a und pET-32b überexprimierten Transkriptvariante B von 11 β -HSD 3. In blau ist der Unterschied in der Aminosäuresequenz zwischen dem *Trx-Tag* und dem Zielprotein hervorgehoben.

Schon der Austausch einzelner Aminosäuren kann Auswirkungen auf die Löslichkeit bzw. die Aktivität eines Enzyms haben [115;116]. Da sich aber im vorliegenden Fall der Sequenzunterschied in unmittelbarer Nähe zum *Trx-Tag* und in ausreichender Entfernung zur Kofaktorbindestelle befindet, ist auch diese Möglichkeit als Ursache für das Ausbleiben von Aktivität eher unwahrscheinlich. Somit bleibt unbestätigt, dass es sich bei Cortisol um ein Substrat der 11 β -HSD 3 handelt und diese ihren Namen zu Recht trägt.

Die abschließende Überexpression und Reinigung unter Verwendung des Vektors pET-43b verlief analog zur Transkriptvariante E erfolgreich. Jedoch konnten auch hier weder bei den Untersuchungen mittels der empfindlicheren HPLC-Methode noch unter Verwendung der photometrischen Messung der Abnahme des Kofaktors Umsetzungen nachgewiesen werden.

7.2.1.3 Ausblick für die Klonierung der 11 β -HSD 3

Zu Beginn der Arbeit galt die Transkriptvariante E für 11 β -HSD 3 als Leitvariante. Inzwischen führt die *GenBank*®-Datenbank zehn unterschiedliche Transkriptvarianten (Stand Juni 2013), von denen die Transkriptvariante G (NM_001267868) das längste Protein kodiert und somit als Leitvariante angesehen werden muss. Durch ein zusätzliches Exon kommt es bei der Transkriptvariante G zu einem früheren Translationsstart gegenüber Transkriptvariante B und somit zu einem längerem Protein (siehe Abb. 7.7).

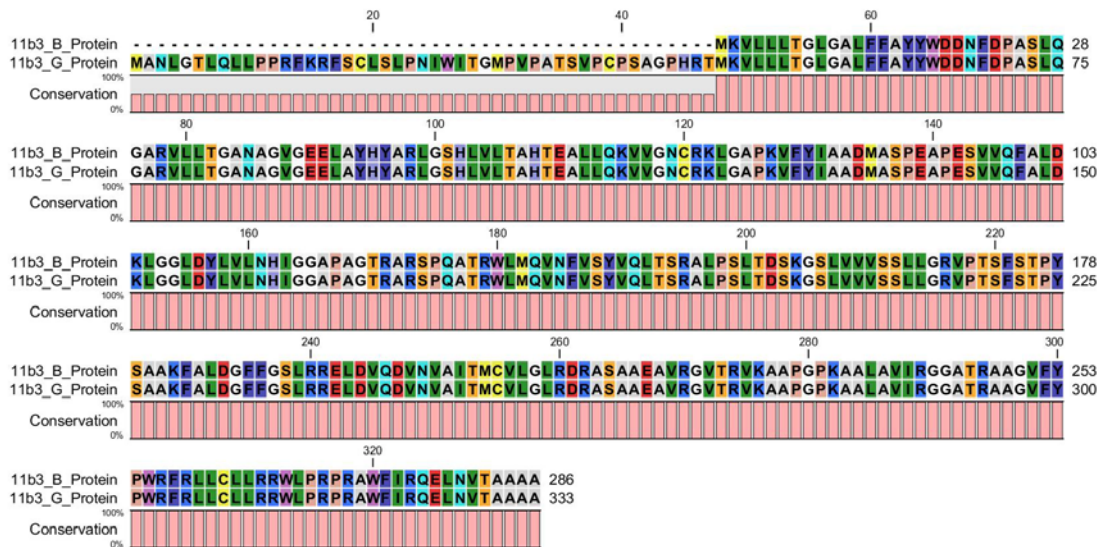


Abb. 7.7: Protein-Alignment der Isoformen B und G von 11 β -HSD 3. Durch ein zusätzliches Exon kommt es bei der Transkriptvariante G zu einem früheren Translationsstart.

Da sich die Isoform E nur mit Hilfe des sehr großen *Nus-Tags* ausreichend in die lösliche Fraktion bringen ließ, und sich die publizierte Umsetzung von Cortisol für die Isoform B nicht bestätigen ließ, sollten zukünftige Arbeiten versuchen, auch die Isoform G durch bakterielle Überexpression zu erhalten, um zu überprüfen, ob sich hier eine Umsetzung von Cortisol nachweisen lässt.

7.2.2 Klonierung einer homologen 11 β -HSD 1 aus *Caenorhabditis elegans*

Die rekombinante Herstellung einer homologen 11 β -HSD 1 aus *Caenorhabditis elegans* sollte die Schwierigkeiten der rekombinanten Herstellung des humanen Proteins umgehen und gleichzeitig Untersuchungen ermöglichen, für die umfangreichere Proteinmengen notwendig sind.

Nach Klonierung der DNA in den Vektor pET-43b und erfolgreicher Sequenzierung gelang es, das Protein DHS-30 mittels Überexpression in Origami (DE3) zu erhalten und aufzureinigen. Eine Aufreinigung nach Thrombinverdau misslang, weshalb Substratuntersuchungen mit dem Fusionsprotein durchgeführt wurden.

Unglücklicherweise ließen sich weder durch die Untersuchungen mittels HPLC-Methode (Cortisol, Cortison, Metyrapon und Oracin) noch durch die photometrischen Messungen der Abnahme des Kofaktors (Liste der Substanzen im Anhang in Tabelle 18) Hinweise auf mögliche Substrate erhalten. Für zukünftige Arbeiten sollte versucht werden, die kodierende DNA in andere Vektoren zu klonieren, um auszuschließen, dass der voluminöse *Nus-Tag* eventuell einen Substratumsatz verhindert.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Löffler, G., P.E. Petrides, and P.C. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 8. **2006**, Heidelberg, Springer Verlag.
- [2] Alberts, B., et al., *Molekularbiologie der Zelle*. Vol. 5. **2011**, Weinheim, Wiley VCH.
- [3] Nixon, M., R. Andrew, and K.E. Chapman, *It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions*. *Steroids*, **2013**, 78, 59-68.
- [4] Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Stryer Biochemie (German Edition)*. Vol. 7. **2013**, Heidelberg, Springer Spektrum.
- [5] Hillier, S.G., *Diamonds are forever: the cortisone legacy*. *J Endocrinol*, **2007**, 195, 1-6.
- [6] Rosen, J. and J.N. Miner, *The search for safer glucocorticoid receptor ligands*. *Endocr Rev*, **2005**, 26, 452-464.
- [7] Nissen, R.M. and K.R. Yamamoto, *The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain*. *Genes Dev*, **2000**, 14, 2314-2329.
- [8] Vagnerová, K., et al., *Intestinal inflammation modulates expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in murine gut*. *J Endocrinol*, **2006**, 191, 497-503.
- [9] Chapman, K.E., et al., *11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-- a role in inflammation?* *Mol Cell Endocrinol*, **2006**, 248, 3-8.
- [10] Chapman, K.E., et al., *The role and regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the inflammatory response*. *Mol Cell Endocrinol*, **2009**, 301, 123-131.
- [11] Edwards, C.R. and P.M. Stewart, *The cortisol-cortisone shuttle and the apparent specificity of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **1991**, 39, 859-865.
- [12] Stewart, P.M., et al., *Syndrome of apparent mineralocorticoid excess. A defect in the cortisol-cortisone shuttle*. *J Clin Invest*, **1988**, 82, 340-349.
- [13] Wamil, M. and J.R. Seckl, *Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a promising therapeutic target*. *Drug Discov Today*, **2007**, 12, 504-520.

- [14] Hughes, K.A., S.P. Webster, and B.R. Walker, *11-Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11beta-HSD1) inhibitors in type 2 diabetes mellitus and obesity*. *Expert Opin Investig Drugs*, **2008**, 17, 481-496.
- [15] Staab, C.A. and E. Maser, *11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2010**, 119, 56-72.
- [16] Walker, B.R., *Cortisol--cause and cure for metabolic syndrome?* *Diabet Med*, **2006**, 23, 1281-1288.
- [17] Masuzaki, H., et al., *A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome*. *Science*, **2001**, 294, 2166-2170.
- [18] Newell-Price, J., et al., *Cushing's syndrome*. *Lancet*, **2006**, 367, 1605-1617.
- [19] Persson, B., et al., *The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative*. *Chem Biol Interact*, **2009**, 178, 94-98.
- [20] Jörnvall, H., et al., *Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)*. *Biochemistry*, **1995**, 34, 6003-6013.
- [21] Kavanagh, K.L., et al., *Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes*. *Cell Mol Life Sci*, **2008**, 65, 3895-3906.
- [22] Kallberg, Y., U. Oppermann, and B. Persson, *Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models*. *Febs j*, **2010**, 277, 2375-2386.
- [23] Krozowski, Z., *The 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects*. *Mol Cell Endocrinol*, **1999**, 151, 121-127.
- [24] Krozowski, Z., et al., *The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **1999**, 69, 391-401.
- [25] Oppermann, U.C., B. Persson, and H. Jörnvall, *Function, gene organization and protein structures of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms*. *Eur J Biochem*, **1997**, 249, 355-360.
- [26] Atanasov, A.G., et al., *Direct protein-protein interaction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen*. *Biochim Biophys Acta*, **2008**, 1783, 1536-1543.

-
- [27] Bujalska, I.J., et al., *Hexose-6-phosphate dehydrogenase confers oxo-reductase activity upon 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1*. J Mol Endocrinol, **2005**, 34, 675-684.
- [28] Zhang, Y.-l., et al., *H6PDH interacts directly with 11beta-HSD1: implications for determining the directionality of glucocorticoid catalysis*. Arch Biochem Biophys, **2009**, 483, 45-54.
- [29] Odermatt, A., et al., *The N-terminal anchor sequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane*. J Biol Chem, **1999**, 274, 28762-28770.
- [30] Odermatt, A., et al., *Why is 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 facing the endoplasmic reticulum lumen? Physiological relevance of the membrane topology of 11beta-HSD1*. Mol Cell Endocrinol, **2006**, 248, 15-23.
- [31] Ricketts, M.L., et al., *Immunohistochemical localization of type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues*. J Clin Endocrinol Metab, **1998**, 83, 1325-1335.
- [32] Tannin, G.M., et al., *The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization*. J Biol Chem, **1991**, 266, 16653-16658.
- [33] Hoffmann, F. and E. Maser, *Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily*. Drug Metab Rev, **2007**, 39, 87-144.
- [34] Maser, E., B. Völker, and J. Friebertshäuser, *11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase*. Biochemistry, **2002**, 41, 2459-2465.
- [35] Walker, E.A., et al., *Functional expression, characterization, and purification of the catalytic domain of human 11-beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1*. J Biol Chem, **2001**, 276, 21343-21350.
- [36] Blum, A., H.J. Martin, and E. Maser, *Human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1/carbonyl reductase: recombinant expression in the yeast Pichia pastoris and Escherichia coli*. Toxicology, **2000**, 144, 113-120.
- [37] Nobel, C.S.I., F. Dunås, and L.B. Abrahmsén, *Purification of full-length recombinant human and rat type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases with retained oxidoreductase activities*. Protein Expr Purif, **2002**, 26, 349-356.

- [38] Bruley, C., et al., *A novel promoter for the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene is active in lung and is C/EBPalpha independent*. *Endocrinology*, **2006**, 147, 2879-2885.
- [39] Morton, N.M. and J.R. Seckl, *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and obesity*. *Front Horm Res*, **2008**, 36, 146-164.
- [40] Maser, E. and G. Bannenberg, *11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mediates reductive metabolism of xenobiotic carbonyl compounds*. *Biochem Pharmacol*, **1994**, 47, 1805-1812.
- [41] Odermatt, A. and L.G. Nashev, *The glucocorticoid-activating enzyme 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 has broad substrate specificity: Physiological and toxicological considerations*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2010**, 119, 1-13.
- [42] Maser, E., *11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes*. *Cancer Res*, **1998**, 58, 2996-3003.
- [43] Maser, E., J. Friebertshäuser, and B. Völker, *Purification, characterization and NNK carbonyl reductase activities of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: enzyme cooperativity and significance in the detoxification of a tobacco-derived carcinogen*. *Chem Biol Interact*, **2003**, 143-144, 435-448.
- [44] Maser, E., E. Richter, and J. Friebertshäuser, *The identification of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase as carbonyl reductase of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone*. *Eur J Biochem*, **1996**, 238, 484-489.
- [45] Finckh, C., et al., *Expression and NNK reducing activities of carbonyl reductase and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human lung*. *Chem Biol Interact*, **2001**, 130-132, 761-773.
- [46] Ter-Minassian, M., et al., *Genetic variability in the metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) to 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL)*. *Int J Cancer*, **2012**, 130, 1338-1346.
- [47] Wsól, V., et al., *The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1*. *Toxicology*, **2004**, 197, 253-261.
- [48] Maser, E., T. Gebel, and K.J. Netter, *Carbonyl reduction of metyrapone in human liver*. *Biochem Pharmacol*, **1991**, 42 Suppl, S93-S98.

- [49] Friso, S., et al., *Epigenetic control of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene promoter is related to human hypertension*. *Atherosclerosis*, **2008**, 199, 323-327.
- [50] Isomura, Y., et al., *Physiologic roles of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in kidney*. *Metabolism*, **2006**, 55, 1352-1357.
- [51] Albiston, A.L., et al., *Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme*. *Mol Cell Endocrinol*, **1994**, 105, R11-R17.
- [52] Ferrari, P., *The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension*. *Biochim Biophys Acta*, **2010**, 1802, 1178-1187.
- [53] Edwards, C.R., et al., *Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor*. *Lancet*, **1988**, 2, 986-989.
- [54] Funder, J.W., et al., *Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated*. *Science*, **1988**, 242, 583-585.
- [55] Williams, G.H., *Guardian of the gate: receptors, enzymes, and mineralocorticoid function*. *J Clin Endocrinol Metab*, **1992**, 74, 961-962.
- [56] Pascual-Le Tallec, L. and M. Lombès, *The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action*. *Mol Endocrinol*, **2005**, 19, 2211-2221.
- [57] Reynolds, R.M., *Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: two decades of testing the hypothesis--2012 Curt Richter Award Winner*. *Psychoneuroendocrinology*, **2013**, 38, 1-11.
- [58] Atanasov, A.G., et al., *Impaired protein stability of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2: a novel mechanism of apparent mineralocorticoid excess*. *J Am Soc Nephrol*, **2007**, 18, 1262-1270.
- [59] Stewart, P.M., et al., *Hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess due to mutation of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene*. *Lancet*, **1996**, 347, 88-91.
- [60] Rogoff, D., et al., *The codon 213 of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene is a hot spot for mutations in apparent mineralocorticoid excess*. *J Clin Endocrinol Metab*, **1998**, 83, 4391-4393.
- [61] Tsugita, M., et al., *Differential regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and -2 gene transcription by proinflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells*. *Life Sci*, **2008**, 83, 426-432.

- [62] Kostadinova, R.M., et al., *Tumor necrosis factor alpha and phorbol 12-myristate-13-acetate down-regulate human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 through p50/p50 NF-kappaB homodimers and Egr-1*. *FASEB J*, **2005**, 19, 650-652.
- [63] Gomez-Sanchez, E.P., et al., *The sheep kidney contains a novel unidirectional, high affinity NADP(+)-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 beta-HSD-3)*. *Steroids*, **1997**, 62, 444-450.
- [64] Gomez-Sanchez, E.P., et al., *11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases of the choriocarcinoma cell line JEG-3 and their inhibition by glycyrrhetic acid and other natural substances*. *Steroids*, **1996**, 61, 110-115.
- [65] Möbus, E., J.J. Hermans, and E. Maser, *Characterization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in the renal cell line LLC-PK1: evidence for a third isoform?* *Endocrine*, **1999**, 11, 301-307.
- [66] Huang, C., et al., *Isolation and characterization of novel human short-chain dehydrogenase/reductase SCDR10B which is highly expressed in the brain and acts as hydroxysteroid dehydrogenase*. *Acta Biochim Pol*, **2009**, 56, 279-289.
- [67] MacLulich, A.M.J., et al., *Plasma cortisol levels, brain volumes and cognition in healthy elderly men*. *Psychoneuroendocrinology*, **2005**, 30, 505-515.
- [68] Sandeep, T.C., et al., *11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition improves cognitive function in healthy elderly men and type 2 diabetics*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**, 101, 6734-6739.
- [69] Baker, M.E., *Evolutionary analysis of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-type 1, -type 2, -type 3 and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-type 2 in fish*. *FEBS Lett*, **2004**, 574, 167-170.
- [70] Baker, M.E., *Evolution of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-type 1 and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-type 3*. *FEBS Lett*, **2010**, 584, 2279-2284.
- [71] LaVallie, E.R., et al., *A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm*. *Biotechnology (N Y)*, **1993**, 11, 187-193.
- [72] Davis, G.D., et al., *New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, **1999**, 65, 382-388.
- [73] Burgess-Brown, N.A., et al., *Codon optimization can improve expression of human genes in Escherichia coli: A multi-gene study*. *Protein Expr Purif*, **2008**, 59, 94-102.

- [74] Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, **1987**, 196, 261-282.
- [75] Clark, S.J., et al., *High sensitivity mapping of methylated cytosines*. Nucleic Acids Res, **1994**, 22, 2990-2997.
- [76] Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1992**, 89, 1827-1831.
- [77] Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, **2001**, 25, 402-408.
- [78] Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, **2008**, 3, 1101-1108.
- [79] Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Vol. 5. **2006**, München, Spektrum Akademischer Verlag.
- [80] Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, **1976**, 72, 248-254.
- [81] Novotna, R., et al., *Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3*. Toxicol Lett, **2008**, 181, 1-6.
- [82] Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, **2009**, 55, 611-622.
- [83] Gubbay, O., et al., *Inflammation-associated gene expression is altered between normal human ovarian surface epithelial cells and cell lines derived from ovarian adenocarcinomas*. Br J Cancer, **2005**, 92, 1927-1933.
- [84] Rabbitt, E.H., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenases, cell proliferation and malignancy*. J Steroid Biochem Mol Biol, **2003**, 85, 415-421.
- [85] Rabbitt, E.H., et al., *Prereceptor regulation of glucocorticoid action by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a novel determinant of cell proliferation*. Faseb j, **2002**, 16, 36-44.
- [86] Sai, S., et al., *Glucocorticoid regulation of the promoter of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is indirect and requires CCAAT/enhancer-binding protein-beta*. Mol Endocrinol, **2008**, 22, 2049-2060.
- [87] Williams, L.J., et al., *C/EBP regulates hepatic transcription of 11beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-*

- talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways.* J Biol Chem, **2000**, 275, 30232-30239.
- [88] Gout, J., et al., *CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs) regulate the basal and cAMP-induced transcription of the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase encoding gene in adipose cells.* Biochimie, **2006**, 88, 1115-1124.
- [89] Arikawa, E., et al., *Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study.* BMC Genomics, **2008**, 9, 328.
- [90] Blum, A., H.J. Martin, and E. Maser, *Human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is enzymatically active in its nonglycosylated form.* Biochem Biophys Res Commun, **2000**, 276, 428-434.
- [91] Rath, A., et al., *Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, **2009**, 106, 1760-1765.
- [92] Rath, A., et al., *Novel hydrophobic standards for membrane protein molecular weight determinations via sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.* Biochemistry, **2010**, 49, 10589-10591.
- [93] Baker, M.E., *Evolution of mammalian 11beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases-type 2 and retinol dehydrogenases from ancestors in Caenorhabditis elegans and evidence for horizontal transfer of a eukaryote dehydrogenase to E. coli.* J Steroid Biochem Mol Biol, **1998**, 66, 355-363.
- [94] Persson, B., M. Krook, and H. Jörnvall, *Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes.* Eur J Biochem, **1991**, 200, 537-543.
- [95] Kallberg, Y., et al., *Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes.* Protein Sci, **2002**, 11, 636-641.
- [96] Filling, C., et al., *Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases.* J Biol Chem, **2002**, 277, 25677-25684.
- [97] Oppermann, U., et al., *Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update.* Chem Biol Interact, **2003**, 143-144, 247-253.
- [98] Chapman, K.E., et al., *Local amplification of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the inflammatory response.* Ann N Y Acad Sci, **2006**, 1088, 265-273.

- [99] Escher, G., et al., *Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta enhance the cortisone/cortisol shuttle*. J Exp Med, **1997**, 186, 189-198.
- [100] Hardy, R.S., et al., *Differential expression, function and response to inflammatory stimuli of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human fibroblasts: a mechanism for tissue-specific regulation of inflammation*. Arthritis Res Ther, **2006**, 8, R108.
- [101] Tomlinson, J.W., et al., *Regulation of expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines*. Endocrinology, **2001**, 142, 1982-1989.
- [102] Tomlinson, J.W., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response*. Endocr Rev, **2004**, 25, 831-866.
- [103] Cai, T.Q., et al., *Induction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 but not -2 in human aortic smooth muscle cells by inflammatory stimuli*. J Steroid Biochem Mol Biol, **2001**, 77, 117-122.
- [104] Cooper, M.S., et al., *Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation*. J Bone Miner Res, **2001**, 16, 1037-1044.
- [105] Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, **1999**, 18, 6853-6866.
- [106] Zbáňková, S., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis*. J Gastroenterol Hepatol, **2007**, 22, 1019-1023.
- [107] Takahashi, K.I., et al., *Type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human colonic epithelial cells of inflammatory bowel disease*. Dig Dis Sci, **1999**, 44, 2516-2522.
- [108] Ray, P., et al., *Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor*. FEBS Lett, **1997**, 409, 79-85.
- [109] Cvero, A., et al., *Selective estrogen receptor-beta agonists repress transcription of proinflammatory genes*. J Immunol, **2008**, 180, 630-636.
- [110] Harris, H.A., et al., *Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease*. Endocrinology, **2003**, 144, 4241-4249.
- [111] Pogribny, I.P. and S.J. James, *Reduction of p53 gene expression in human primary hepatocellular carcinoma is associated with promoter*

- region methylation without coding region mutation.* Cancer Lett, **2002**, 176, 169-174.
- [112] Chen, C., M.C. Yang, and T.P. Yang, *Evidence that silencing of the HPRT promoter by DNA methylation is mediated by critical CpG sites.* J Biol Chem, **2001**, 276, 320-328.
- [113] Mamrut, S., et al., *DNA methylation of specific CpG sites in the promoter region regulates the transcription of the mouse oxytocin receptor.* PLoS One, **2013**, 8, e56869.
- [114] Inder, W.J., et al., *Evidence for transcript-specific epigenetic regulation of glucocorticoid-stimulated skeletal muscle 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 activity in type 2 diabetes.* Clin Epigenetics, **2012**, 4, 24.
- [115] Lawson, A.J., et al., *Mutations of key hydrophobic surface residues of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 increase solubility and monodispersity in a bacterial expression system.* Protein Sci, **2009**, 18, 1552-1563.
- [116] El-Hawari, Y., et al., *Analysis of the substrate-binding site of human carbonyl reductases CBR1 and CBR3 by site-directed mutagenesis.* Chem Biol Interact, **2009**, 178, 234-241.

9 Anhang

9.1 PCR-Temperaturprogramme

9.1.1 Temperaturprogramme bei herkömmlicher PCR

Für herkömmliche Polymerase-Kettenreaktionen wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet (siehe Kapitel 2.7). Aufgeführt sind die entsprechenden Temperaturprogramme. Die fett markierten Programmschritte wurden je nach Anwendung 25- bis 50-mal wiederholt. Die Annealingtemperaturen richteten sich nach den verwendeten Oligonukleotiden.

Schritt	Phire ^y		Phusion ^z		KAPA2G ^{aa}	
	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.
Initiale Denaturierung	30s	98°C	30s	98°C	3min	95°C
Denaturierung	15s	98°C	10s	98°C	30s	95°C
Annealing	20s	x°C	30s	x°C	15s	63°C
Elongation	20s	72°C	30s	72°C	20s	68°C
Finale Elongation	2min	72°C	10min	72°C	20s	68°C
Kühlung	Pause	4°C	Pause	4°C	Pause	4°C

Tabelle 15: PCR-Programme für die unterschiedlichen Anwendungen/Polymerasen.

^y Phire Hot Start DNA Polymerase (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

^z Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

^{aa} KAPA2G™ Robust DNA Polymerase (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)

9.1.2 Temperaturprogramme bei der quantitativen Real-Time-RT-PCR

Nach Inkubation und Aktivierungsphase folgten bei beiden Geräten 40 Zyklen im Two-Step-Verfahren, d.h. bei gleichzeitiger Annealing- und Elongationsphase. Zeiten und Temperaturen der unterschiedlichen Schritte sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Schritt	Zeit	Temperatur
Inkubation	2min	50°C
Aktivierung	10min	95°C
Denaturierung	15s	95°C
Annealing/Elongation	1min	60°C

Tabelle 16: Temperaturprogramm der qRT-PCR-Geräte ABI 7500 Fast und ABI Prism 7900HT. Es erfolgten jeweils 40 Zyklen.

9.2 Verwendete Oligonukleotide

#	Verwendung	Name	Sequenz
1	PCR	beta-actin fwd	actcttcagccttcctcct
2	PCR	beta-actin rev	aggttttgtcaagaaaggggtg
29	PCR	11bHSD1-5'	gacatgacctcgcagagcaattgt
30	PCR	11bHSD1-3'	gaggccaagaacacagagagtattga
84	PCR	GR alpha fwd	taccctgcatgtacgaccaa
85	PCR	GR alpha rev	tttggtatctgattgggtatga
117	PCR	11b1-P1-5'	ggagggagagagagagaagagaaga
118	PCR	11b1-P1+P2-3'	cttgagcatctctggctgtaa
218	PCR	11b1-P2-5'	ctgctgcttaggaggtgt
205	S-PCR	11b3E_nde1-5'	agctttcatatgatgaaggtgcttctc
206	S-PCR	11b3E_bamh1-3'	ttcagcggatcctcaatcatggccaaa
222	S-PCR	11b3B_bamh1-3'	ttcagcggatcctcaggctgccgcggc
226	S-PCR	11b3E_ecor1-5'	agctttgaattcGatgaaggtgcttctc ^{bb}
227	S-PCR	11b3E_xho1-3'	ttcagcctcgagatcatggccaaa
231	SEQ	S-Tag	cgaacgccagcacatggaca
232	SEQ	pLICfor	tgtgagcggataacaattcc
233	SEQ	T7term	gctagtattgctcagcgg
234	SEQ	pLICrev	agcagccaactcagcttcc
248	S-PCR	11b3B_xho1-3'	ttcagcctcgagggtgccgcggc
277	SEQ	5-Nus-Tag	aagccggagcactgattatg
278	SEQ	3-ColiDo	ttcacttctgagttcggcatg
300	SEQ	pCI-neofwd	taatacgactcactatagg
303	S-PCR	11b3B_nde-5'	agctttcatatgatgaaggtgcttctctcaca
304	S-PCR	11b3B_eco-5'	agctttgaattcGatgaaggtgcttctctca ^{bb}
341	MUT	5'-MutBg431a	gtgagctacgtgcaactgacgtcgcggg
342	MUT	3'-MutBg431a	cccgcgacgtcagttgcacgtagctcac
503	PCR	CEBPalphaFWD	tactgagtagggggagcaaa
504	PCR	CEBPalphaREV	accaggggtatacatcctca
505	PCR	CEBPbetaFWD	cagcgcagagtacaagatcc
506	PCR	CEBPbetaREV	taaaattaccgacgggctc
507	PCR	5'-PyroGR	gtagaaggagtaggagggaaata
508	PCR	3'-PyroGR-Biotin	Biotin-cccaaaccactacccttt
509	SEQ	Seq-PyroGR	ttttattgttagttgataagttag
998	S-PCR	DHS-30-43b-5'	agctttgaattcAatggtgccgtaaaa ^{cc}
999	S-PCR	DHS-30-43b-3'	ttcagcctcgagctccttctgtt

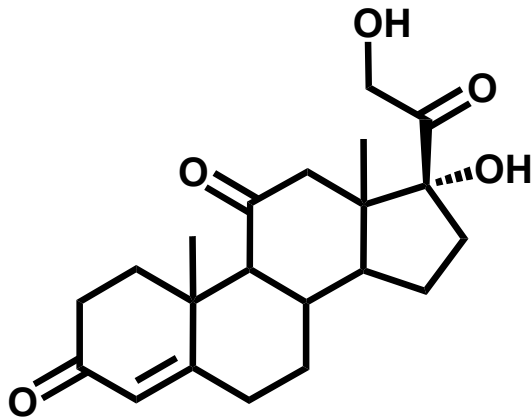
Tabelle 17: Verwendete Oligonukleotide (Verwendungsbezeichnung: PCR = Einsatz bei einer gewöhnlichen PCR-Reaktion, S-PCR = Einsatz bei Schnittstellen-PCR, SEQ = Verwendung zur Sequenzierung eines Plasmids, MUT = Primer für eine ortsgerichtete Mutagenese).

^{bb} Das an Position 13 hier als Großbuchstabe hervorgehobene Guanin verhindert bei der Klonierung in pET43b einen Frameshift.

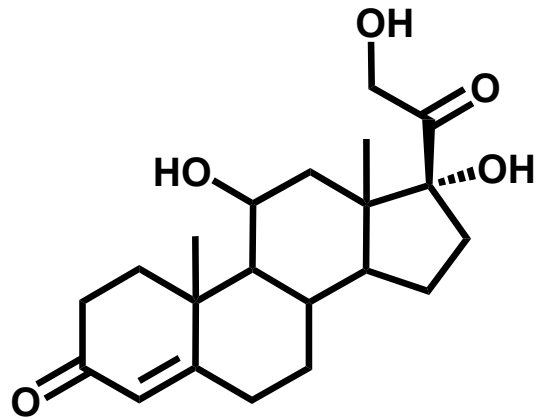
^{cc} Das an Position 13 hier als Großbuchstabe hervorgehobene Adenin verhindert bei der Klonierung in pET43b einen Frameshift.

9.3 Substratliste

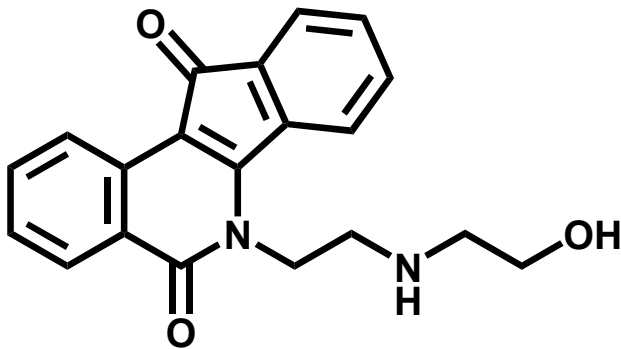
9.3.1 Substrate HPLC



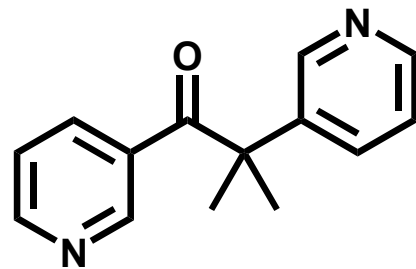
Cortison



Cortisol








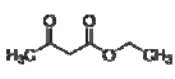

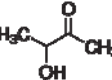



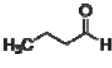
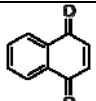
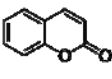

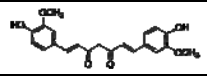

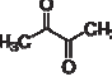
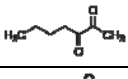

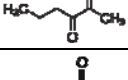

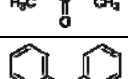
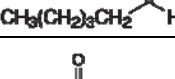
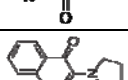
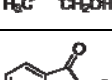

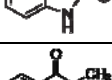
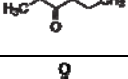
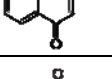
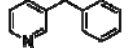

Oracin



Metyrapon

Abb. 9.1: Zu sehen sind die als mögliche Substrate mittels HPLC untersuchten Substanzen Cortison, Cortisol, Oracin und Metyrapon.

9.3.2 Substrate

Substanz	Formel	Konz. ^{dd}	Substanz	Formel	Konz. ^{dd}
(1R)-(-)-Campherchinon		10 mM ^{ee}	Acenaphthenchinon		10 mM ^{ee}
(1S)-(+)-Campherchinon		10 mM ^{ee}	Acetaldehyd		10 mM ^{ff}
1,2-Cyclohexandion		10 mM ^{ee}	Acetessigester		10 mM ^{ff}
1,2-Naphthochinon		10 mM ^{ee}	Acetoin		10 mM ^{ee}
1,3-Cyclohexandion		10 mM ^{ee}	Acetophenon		10 mM ^{ff}
1,4-Benzochinon		10 mM ^{ee}	Butanal		10 mM ^{ff}
1,4-Naphthochinon		10 mM ^{ee}	Coumarin		10 mM ^{ee}
1-Indanon		10 mM ^{ee}	Curcumin		100 μM ^{ee}
2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion		10 mM ^{ff}	Diacetyl		10 mM ^{ff}
2,3-Heptandion		10 mM ^{ff}	Furfural		10 mM ^{ff}
2,3-Hexandion		10 mM ^{ff}	Glycerinaldehyd		10 mM ^{ff}
2,3-Pentandion		10 mM ^{ff}	Hexanal		10 mM ^{ff}
2-Benzoylpyridin		10 mM ^{ee}	Hydroxyaceton		10 mM ^{ff}
2-Chloro-3-pyrrolidino-1,4-naphthochinon		10 mM ^{ee}	Isatin		10 mM ^{ee}
3,4-Hexandion		10 mM ^{ff}	Menadion		10 mM ^{ee}
3-Benzoylpyridin		10 mM ^{ee}	Methylglyoxal		10 mM ^{ff}

^{dd} Konzentration der Substratlösungen für Substratuntersuchung mit dem Cary 100 Scan Photometer

^{ee} Gelöst in DMSO

^{ff} Gelöst in H₂O

Anhang

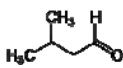
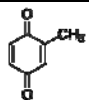
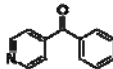
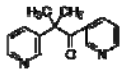
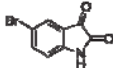
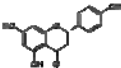


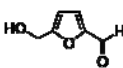
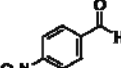
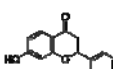

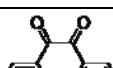
Substanz	Formel	Konz. ^{dd}	Substanz	Formel	Konz. ^{dd}
3-Methylbutanal		10 mM ^{ff}	Methyl-p-Benzochinon		10 mM ^{ee}
4-Benzoylpyridin		10 mM ^{ee}	Metyrapon		10 mM ^{ee}
5-Bromoisatin		10 mM ^{ee}	Naringenin		10 mM ^{ee}
5-Hydroxy-1,4-Naphthochinon		10 mM ^{ee}	p-Nitroaceto-phenon		10 mM ^{ee}
5-Hydroxymethyl-furfural		10 mM ^{ff}	p-Nitrobenzaldehyd		10 mM ^{ee}
7-Hydroxyflavon		100 μM ^{ee}	Trans-1-decalon		10 mM ^{ee}
9,10-Phenanthrenchinon		100 μM ^{ee}			

Tabelle 18: Liste der mittels photometrischen Messung auf Abnahme des Kofaktors auf mögliche Umsetzung getesteten Substanzen.