

**Untersuchungen zu
molekularen Mechanismen der Glucocorticoid-Resistenz
bei Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Heike Hennig
aus Wilhelmshaven

Göttingen 2003

D7

Referent: Prof. Dr. R. Hardeland

Korreferent: Prof. Dr. D. Doenecke

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2003

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung von Glucocorticoiden und klinische Aspekte der Glucocorticoid-Sensitivität.....	1
1.2 Bedeutung des Glucocorticoidrezeptors	1
1.3 Aufbau des humanen Glucocorticoidrezeptors	2
1.4 Varianten des Glucocorticoidrezeptors	4
1.5 Wirkungsweise des humanen Glucocorticoidrezeptors	6
1.6 Regulation des humanen Glucocorticoidrezeptors.....	8
1.7 Ziel und Aufgabenstellung	9
2. Material	10
2.1 Antikörper	10
2.1.1 Primäre Antikörper.....	10
2.1.2 Sekundäre Antikörper	10
2.2 Zellen.....	10
2.3 Oligonukleotide.....	11
2.4 Enzyme.....	11
2.5 Chemikalien und andere Materialien	11
2.6 Geräte	13
3. Methoden	15
3.1 Präparation und Analyse von DNA.....	15
3.1.1 Reinigung und Konzentrierung von DNA	15
3.1.1.1 Reinigung durch Phenolisierung und Alkohol-Präzipitation	15
3.2 Isolierung von DNA	15
3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	15

3.2.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	17
3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	17
3.3 Enzymatische Behandlung von DNA: Restriktionsanalyse.....	18
3.4 Amplifikation von cDNA-Fragmenten durch PCR.....	19
3.5 Präparation und Analyse von RNA.....	20
3.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	21
3.5.1.1 Guanidinium/Phenol-Chloroform-Methode.....	21
3.5.1.2 Gesamt-RNA-Isolierung über Silikagel-Membran.....	21
3.5.2 Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA und aus in-vitro-transkribierter RNA.....	23
3.6 RNA-Synthese: In-vitro-Transkription.....	23
3.7 Biochemische Methoden.....	24
3.7.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	24
3.7.2 Auftrennung von Proteinen mit SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE).....	25
3.7.3 Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE.....	25
3.7.4 Western-Blot-Analyse.....	26
3.7.5 Immunpräzipitationen.....	27
3.8 Zellbiologische Methoden.....	28
3.8.1 Reaktivierung von Zellkulturen.....	28
3.8.2 Kryokonservierung von Zellen.....	28
3.8.3 Suspensionszellkultur.....	29
3.8.4 Isolierung von mononukleären Zellen (Lymphozyten und Lymphoblasten).....	29
3.8.5 Lebendzellzahlbestimmung durch Trypanblaufärbung.....	30
3.8.6 Internalisierungsexperimente mit ³ H-markiertem Dexamethason.....	30
3.8.7 Transiente Transfektion von leukämischen Zellen.....	30
3.8.8 Reportergenanalyse.....	31
3.8.9 X-Gal Färbung.....	32
3.9 Statistische Methoden.....	33
4. Ergebnisse.....	34
4.1 Etablierung der quantitativen, kompetitiven RT-PCR.....	34
4.2 Quantitative Bestimmung der hGR-mRNA am Beispiel eines ALL-Patienten.....	35
4.3 Bestimmung der hGR-mRNA in Lymphoblasten und Lymphozyten.....	37
4.3.1 Quantifizierung der hGR-mRNA in Lymphoblasten des Knochenmarks von ALL-Patienten und gesunden Kontrollpersonen.....	37
4.3.2 Quantifizierung der hGR-mRNA in Lymphozyten des peripheren Blutes von ALL-Patienten und gesunden Kontrollpersonen.....	37
4.4 Aufnahmeexperimente von ³ H-markiertem Dexamethason in leukämischen Zelllinien.....	39

4.5	Bestimmung des hGR-Proteins in leukämischen Zelllinien	41
4.6	Untersuchungen zur Signaltransduktionskaskade des hGR.....	42
4.6.1	Etablierung von transienten Transfektionen und Reporteranalysen bei Zelllinien und Primärzellen von ALL-Patienten.....	42
4.6.2	Vergleich der Reporteraktivitäten zwischen „good“-und „poor-responder“- Patienten.....	43
4.7	Untersuchungen zu Proteininteraktionen des hGR im Cytosol.....	45
4.7.1	Der hGR im Komplex mit dem Hitzeschockprotein HSP90.....	46
4.7.2	Der hGR im Komplex mit den Immunophilinen FKBP51 und FKBP52.....	48
4.8	Untersuchungen zur Phosphorylierung des hGR und des Immunophilins FKBP52	53
5.	Diskussion	56
5.1	Der Glucocorticoidrezeptor bei Leukämien.....	56
5.2	Der hGR in Lymphozyten.....	57
5.3	Charakterisierung des hGR auf RNA-Ebene	58
5.3.1	Quantitative Messung von Expressionsprodukten	58
5.3.2	Anwendung der kompetitiven RT-PCR	59
5.3.3	Der interne Standard in einer quantitativen PCR.....	60
5.3.4	Quantifizierung der hGR-mRNA in Lymphozyten und Lymphoblasten.....	61
5.4	„Multidrug“-Resistenz und Aufnahme von GC in Leukämiezellen	63
5.5	Charakterisierung des hGR auf Protein-Ebene	64
5.6	Signaltransduktion und Reporter-Analyse des hGR	65
5.7	Proteininteraktion des hGR im Cytoplasma.....	65
5.8	Phosphorylierung des hGR und des Immunophilins FKBP52.....	68
5.9	Polymorphismen und somatische Mutationen des hGR-Gens.....	69
5.10	Glutathion und Glutathion S-Transferase	71
Ausblick	71
6.	Zusammenfassung	72

7. Summary	74
8. Literaturverzeichnis	75

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bid.	2-fach destilliert
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie (1Ci=3,7 x 10 ¹⁰ Becquerel)
cpm	gezählte Zerfälle/Minute
Da	Dalton
ddNTP	2', 3'-Dideoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
ETOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm
GC	Glucocorticoid(e)
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid Response Element

x g	-fache Erdbeschleunigung (9,81m/Sekunde ²)
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hGR	humaner Glucocorticoidrezeptor
HSP	Hitzeschockprotein(e)
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LBD	Ligandenbindungsdomäne
M	molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute(n)
mRNA	Botenribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nt	Nukleotide
OD _x	optische Dichte bei x Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	Picomol
RLU	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung/Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
®	„registered“ (eingetragenes Warenzeichen)
s	Sekunde(n)
Sd	Standardabweichung

SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	NaCl-Natriumcitratlösung
SV	Simian Virus
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	Tris-Hydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid
™	„Trademark“ (Warenzeichen)
U	„units“ (Einheit der Enzymaktivität)
ü. N.	über Nacht
U	Uracil
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Glucocorticoiden und klinische Aspekte der Glucocorticoid-Sensitivität

Glucocorticoide (GC) sind in viele biologische Prozesse wie Metabolismus, Entwicklung, Differenzierung, Immunität, Fortpflanzung und neuronale Aktivität involviert. Ihre verschiedenen Wirkungsweisen führen dazu, dass GC zur Behandlung vieler Krankheiten eingesetzt werden. GC können immunsuppressiv, anti-inflammatorisch und anti-proliferierend wirken und sie werden u.a. in onkologischen Therapien eingesetzt. Lymphatische Zellen reagieren nach Zusatz von GC mit Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase und Apoptose. Seit mehr als 50 Jahren macht man sich den anti-leukämischen Effekt (REITER et al., 1994) von den GC wie Dexamethason und Prednison bei der Behandlung von kindlichen Akuten Lymphatischen Leukämien (ALL) zunutze. Ungefähr 10% der Kinder mit ALL sprechen nicht auf die initiale Glucocorticoid-Therapie an; eine noch größere Anzahl weist im weiteren Verlauf eine erworbene Resistenz gegenüber Chemotherapeutika auf (KASPERS et al., 1994; RIEHM et al., 1995). Als prognostischer Faktor kommt dem Ansprechen auf GC eine entscheidende Bedeutung zu: 60% der Patienten, die nicht auf GC ansprechen, werden auch nicht durch die weitere Chemotherapie geheilt (RIEHM et al., 1995). Die Ursache dieser Resistenz ist bislang unbekannt. Ein schlechte Prognose besitzen Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver (Ph+) ALL und T-ALL (SCHRAPPE et al., 1998; ARICO et al., 1995) und pro B-ALL (PIETERS et al., 1998).

1.2 Bedeutung des Glucocorticoidrezeptors

Glucocorticoide wirken über die Glucocorticoidrezeptoren (GR), diese wurden erstmalig 1968 in Thymuszellen von Ratten beschrieben (MUNCK & BRINCK-JOHNSEN; SCHAUMBURG & BOJESSEN, 1968). 1972 folgte die Erstbeschreibung des menschlichen GR in Lymphoblastenzellen von Patienten mit ALL (LIPPMAN et al., 1973). Seitdem wurden GR in nahezu allen Organen oder Geweben von Menschen und Säugetieren nachgewiesen, unter anderem im Gehirn (FUXE et al., 1985; MC EWEN et al., 1968), der Haut (SMITH & SHUSTER, 1987) und in Leukozyten (LIPPMAN & BARR, 1977).

Steroidhormonrezeptoren, zu denen der Glucocorticoid-, Östrogen-, Progesteron-, Androgen-, Mineralkortikoid-, Vitamin-D3- und Ecdysonrezeptor zählen, gehören in die Multigen-Familie der Kern-Rezeptoren („nuclear hormone receptors“), zu denen auch der Thyroidhormon- und der Retinsäurerezeptor zählt (EVANS, 1988). Die cDNAs der oben genannten Rezeptoren wurden isoliert, was eine genaue Charakterisierung der Rezeptorproteine ermöglichte (HOLLENBERG et al., 1985). Alle Rezeptoren haben als gemeinsames Merkmal, dass sie aus mehreren Domänen aufgebaut sind: einem immunogenen aminoterminalen Bereich, einer zwei Zinkfinger enthaltenden DNA-Bindedomäne, die es ermöglicht, sequenzspezifisch DNA zu erkennen und zu binden, und einem carboxyterminalen Bereich, der das entsprechende Hormon bindet (EVANS, 1988; GREEN & CHAMBON, 1986). Durch Bindung des hormonbeladenen Rezeptors an seine Erkennungssequenz werden Gene aktiviert. Der genaue Mechanismus dieser Genregulation ist bis jetzt noch unbekannt.

1.3 Aufbau des humanen Glucocorticoidrezeptors

Zusammen mit den Rezeptoren für Östrogen, Progesteron, Mineralcorticoide, Vitamin-D und Schilddrüsenhormone bildet der humane Glucocorticoidrezeptor (hGR) eine Familie von regulatorischen Proteinen, die Ähnlichkeiten in Struktur und Funktion aufweisen und gemeinsam die Entwicklung des Organismus steuern (GREEN & CHAMBON, 1986; EVANS, 1989; BEATO et al., 1995; MANGELSDORF et al., 1995).

Der hGR ist ein phosphoryliertes monomeres Peptid mit einem Molekulargewicht von etwa 94 kDa, sein Gen ist auf Chromosom 5q31 lokalisiert (EVANS, 1988; GEHRING et al., 1985; THERIAULT et al., 1989). Durch Klonierung der hGR cDNA gelang die Aufklärung der GR-Genstruktur, wobei insgesamt 9 Exons (1-9_α) dem funktionsfähigen humanen GR zuzuordnen sind (HOLLENBERG et al., 1985). Der hGR existiert in zwei sich am Carboxylende unterscheidende Proteinformen, der wesentlich häufigeren, aus 777 Aminosäuren bestehenden α -Form und der aus 742 Aminosäuren aufgebauten β -Form. Beide Isoformen stammen von einem Genort ab und sind das Ergebnis von alternativem Splicing (ENCIO & DETERAWADLEIGH, 1991). Allein die α -Form des hGR zeigt Ligandenbindungsaffinität (HOLLENBERG et al., 1985), die β -Form wird als dominant negativer Inhibitor diskutiert (OAKLEY et al., 1996). Unterteilt wird der hGR in drei Funktionsuntereinheiten oder

Domänen (s. Abb.1). Am N-terminalen Ende befindet sich die von Exon 2 codierte immunogene Domäne, welche antigene Eigenschaften besitzt und von Antikörpern erkannt wird. Desweiteren wird der amino-terminalen Region auch eine transaktivierende Funktion (AF-1) bei der Aktivierung von Zielgenen zugeschrieben (HOLLENBERG & EVANS, 1988). Im mittleren Drittel befindet sich die DNA-bindende Funktionsuntereinheit, welche von den Exons 3 und 4 gebildet wird. Diese Domäne besitzt ein Kernlokalisierungssignal (NLS1) und besteht aus zwei hochkonservierten „Zinkfinger“-Domänen, die entscheidend für die Bindung an die „Glucocorticoid Response Elements“(GRE) sind. Der erste Zinkfinger (Exon 3) codiert Domänen, die für die Bindung von NF- κ B und AP1 nötig sind (TAO et al., 2001) und somit den hGR transreprimieren können. Die zweite Zinkfinger-Domäne (Exon 4) ist für die Dimerisierung und Transaktivierung des hGR verantwortlich (DAHLMAN-WRIGHT et al., 1991; ZILLIACUS et al., 1995; PICARD & YAMAMOTO, 1987; HOLLENBERG et al., 1987). Die von den Exons 5 bis einschließlich 9 α codierte, carboxyterminale Domäne formt den Ligandenbindungsbereich, an dem sich das Glucocorticoid bindet und den hGR aktiviert (GIGUERE et al., 1986; GUSTAFSSON et al., 1987; THOMPSON, 1987). An dieser Domäne binden auch Hitzeschock-Proteine und sie ist für die Dimerisierung des hGRs und dessen Translokation in den Zellkern verantwortlich (NLS2). Weiterhin besitzt diese Region mit AF-2 eine weitere Transaktivierungsdomäne, die zusammen mit AF-1 mit anderen Kernproteinen wie CBP (CREB bindendes Protein) und P300 interagieren kann. Diese Proteine sind für die Stabilisierung und Aktivierung des Transkriptionsinitiationskomplexes der Promoterregionen von glucocorticoid-sensitiven Genen wichtig (BARNES, 1998).

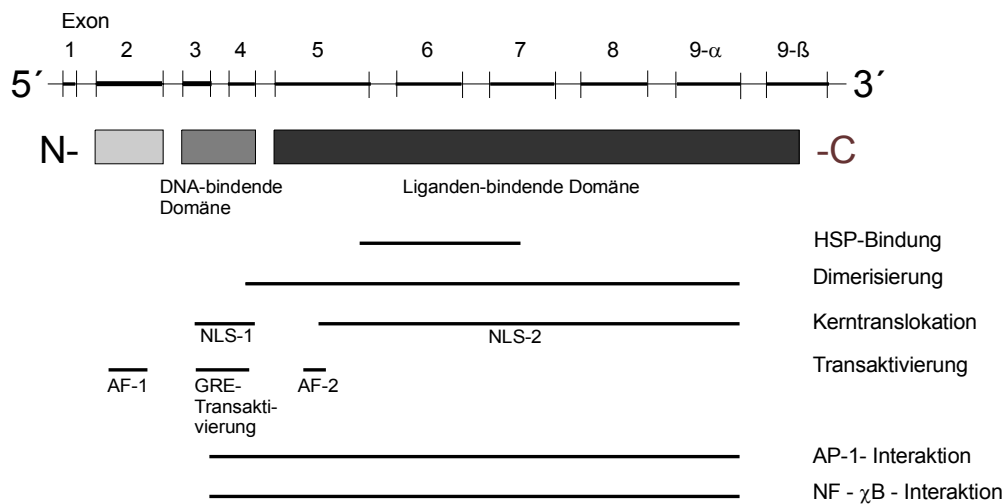


Abb.1: Schematische Darstellung des Genaufbaus, der Proteinstruktur und der Funktionsuntereinheiten des humanen Glucocorticoidrezeptors (modifiziert nach Tissing et al., 2003).

1.4 Varianten des Glucocorticoidrezeptors

Insgesamt wurden bis heute fünf Varianten des hGR-Gens beschrieben, die durch den Vorgang des „alternativen Splicing“ entstehen können: α , β , γ , GR-P und GR-A Isoformen.

Untersuchungen des mRNA-Gehalts von den hGR-Isoformen α , β und GR-P zeigten bisher keine Beziehung zwischen den jeweiligen mRNA-Leveln und der *in vivo* GC-Resistenz bei Patienten mit kindlicher ALL (TISSING et al, 2001).

Die α -Isoform ist der funktionelle Rezeptor und wird von Exon 2 bis 9 α codiert (HOLLENBERG et al., 1985). In Abwesenheit von GC befindet er sich im Cytoplasma und migriert nach Bindung von GC in den Nucleus (OAKLEY et al., 1999b). LONGUI et al. postulierte im Jahr 2000 eine verminderte hGR α -Expression in Lymphoblasten von 13 ALL-Patienten im Vergleich zu EBV-transformierten Lymphozyten von neun gesunden Kontrollpersonen. In Proben von T-ALL-Patienten wurde die geringste hGR α -Expression gemessen, eine Verminderung der hGR β -Isoform wurde in den leukämischen Zellen nicht beobachtet. Trotz des kleinen Patientenkollektivs sieht LONGUI et al. (2000) die verminderte Expression der hGR α -Isoform als eine Ursache für ein schlechtes Ansprechen auf GC von T-ALL-Patienten an.

Die β -Isoform des hGR ist das Resultat des „alternativen Splicing“ von Exon 9 β anstelle von Exon 9 α . Das C-terminale Ende ist im Vergleich mit hGR α um 35 AS verkürzt, so dass hGR β keine Fähigkeit zur GC-Bindung besitzt (HOLLENBERG et al., 1985). Auf Ebene der RNA hat die hGR β -Isoform nur einen Anteil von 0,2-1% an der gesamten hGR-Expression (OAKLEY et al., 1996; TISSING et al., 2001). Auf Proteinebene variieren die Daten aufgrund der fehlenden Spezifität der verwendeten Antikörper stärker und erreichen bis zu fünfmal höhere Werte im Vergleich zum hGR α (DE CASTRO et al., 1996; HECHT et al., 1997). Über die Funktion der β -Isoform des hGR wird gestritten, eine Hypothese ist, dass sie die α -Isoform über die Bildung eines Heterodimers inhibiert und ihr somit einen dominant negativen Effekt zugeprochen wird (OAKLEY et al., 1999a). In mononukleären Zellen des peripheren Blutes (MNZ) von GC-resistenten Asthma-Patienten beschreibt LEUNG et al. (1997) eine erhöhte Expression der hGR β -Isoform als in MNZ von GC-sensitiven Asthmatikern. GAGLIARDO et al. konnte diese Ergebnisse in einer weiteren Studie mit Asthma-Patienten im Jahr 2000 nicht bestätigen. Auch Transfektionsexperimente kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen: Einige Studien beschreiben einen negativen Effekt von GR β über GR α (BAMBERGER et al., 1995; OAKLEY et al., 1999a), andere wiederum nicht (HECHT et al., 1997; DE LANGE et al., 1999; BROGAN et al., 1999).

Die γ -Isoform des hGR wurde 1999 von RIVERS et al. beschrieben. Diese Splicevariante besitzt zusätzlich drei Basenpaare in der DNA-bindenden Domäne zwischen Exon 3 und 4, die für die Aminosäure Arginin codieren. Diese Isoform hat einen Anteil von 3,8-8,7% an der gesamten GR-mRNA-Population und es ist unklar, ob es sich bei dieser Variante um eine eigene Form oder um eine Unterform der α -, β - und GR-P- Isoform handelt. Untersuchungen mit GC-resistenten Lungenkarzinomzellen zeigen, dass die γ -Isoform eine um 50% verminderte biologische Aktivität gegenüber dem Wildtyprezeptor besitzt (RAY et al., 1996). GERDES et al. (2001) untersuchte bei kindlicher ALL die mRNA der γ -Isoform mittels „real-time“-PCR und postulierte eine Verbindung zwischen dieser Form des hGR und dem schlechten Ansprechen auf GC bei kindlichen ALL-Patienten.

Die GR-P Isoform wird von Exon 2-7 codiert und ist aufgrund der fehlenden Ligandenbindungsdomäne nicht imstande GC zu binden (MOALLI et al., 1993). Die GR-P-Transkripte bilden einen Anteil von 10-20% an der gesamten GR mRNA, in einigen kleinen Patientenkollektiven (ALL, Non-Hodgkin-Lymphom, multiples Myelom) wurde sogar ein Anteil von bis zu 54% an der gesamten GR mRNA gemessen (KRETT et al., 1995; SEGEREN et al., 1999; TISSING et al., 2001). Transfektionsexperimente mit GR-P in

malignen, hämatopoetischen Zellen führten zu einer verstärkten Aktivität der GR α -Isoform (DE LANGE et al., 2001). Weiterhin konnte keine Verbindung zwischen dem Ansprechen auf GC bei Patienten mit multiplem Myelom und dem Gehalt von GR α , GR β und GR-P Isoformen hergestellt werden.

Der fünften Variante, der hGR-A, fehlen Exon 5-7, so dass Exon 4 direkt an Exon 8 grenzt. Es liegen keine Informationen über das Expressionsverhalten oder über die Funktion dieser Variante vor (MOALLI et al., 1993).

1.5 Wirkungsweise des humanen Glucocorticoidrezeptors

Im ligandenfreien Zustand liegt der hGR im Cytoplasma der Zelle als heteromeres Komplex mit einem Molekulargewicht von etwa 310 kDa vor (GUSTAFSSON et al., 1989). Hierbei sind an dem hGR mehrere unterschiedliche Proteine gebunden, zwei sogenannte Hitze-Schock-Proteine (HSP90) mit einem Molekulargewicht von 90 kD bzw. 70 kD (HSP70) und Immunophylane (DALMAN et al., 1991; REXIN et al., 1992). In dieser inaktiven Form kann der hGR nicht an die DNA binden (DENIS et al., 1989).

Cortisol, das natürliche menschliche Hormon und die verschiedensten synthetischen Glucocorticoide, z.B. Dexamethason, diffundieren passiv durch die Lipiddoppelmembran der Zellwand in die Zelle. Daneben wurde auch ein aktiver Transport für Cortisol beschrieben (GIORGI & STEIN, 1981; RAO, 1981). Die Glucocorticoide binden sich mit hoher Affinität und Spezifität nicht-kovalent an die spezifische Bindungsstelle des GR (DISTELHORST, 1989). Sie bewirken einen Mechanismus, der den hGR in mehreren Schritten von der nicht DNA-bindenden in die DNA-bindende Form umwandelt. Es werden zwei Modellvorstellungen für diesen Transformations-Prozess zur Zeit diskutiert: zum einen das Heteromer-Dissoziationsmodell, bei dem HSP90, das HSP70 und die Immunophylane vom hGR abdissoziieren und somit die DNA-Bindungsstelle freigeben (DENIS et al., 1988; GROYER et al., 1987; PICARD et al., 1988), zum anderen das Konformationsmodell, das von einer intramolekularen Konformationsänderung des hGR mit Freilegung der DNA-Bindungsstelle ausgeht (GUSTAFSSON et al., 1987; HOLLENBERG et al., 1989). Die Kernlokalisierungssignal-Domänen (NLS) werden aktiviert und der Glucocorticoid-hGR-Komplex gelangt als Homodimer vom Cytosol in den Zellkern (DISTELHORST, 1989; PICARD & YAMAMOTO, 1987).

Im Nucleus bindet sich der aktivierte hGR mit den DNA-bindenden Domänen an spezifische Sequenzen der DNA, die sogenannten Glucocorticoid-Response-Elements (GRE), die in Folge eine Aktivierung oder Repression der Transkription des Zielgens erlauben (TSAI et al., 1988). Die GRE befinden sich meist 5' oberhalb des Promotors des entsprechenden Gens, gelegentlich auch 3'seitig. Sie enthalten übereinstimmend die Basensequenz GGTT/ACANNNTGTT/CCT (BEATO et al., 1987; SCHEIDEREIT et al., 1989). Da verschiedene Gene durch den hGR unterschiedlich reguliert werden, kann der hGR bei identischem Funktionsmechanismus in jedem Gewebe ein anderes spezifisches Aktivitätsmuster erzielen (HARRIGAN et al., 1989). Es treten Unterschiede in der Gewebe- und Zelltypspezifität, in der Reaktion auf verschiedene Stimuli und in Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren auf.

Der Glucocorticoid-hGR-Komplex kann auch direkt mit Transkriptionsfaktoren wie „activating-protein-1“ (AP-1) oder dem Kernfaktor NF- κ B interagieren und über die Bildung eines Transrepressionkomplexes die transkriptionelle Aktivität vom hGR, AP-1 und NF- κ B reprimieren (CIDLOWSKI et al., 1990). Hier haben die oben genannten Transkriptionsfaktoren über die Wechselwirkung mit dem hGR eine wichtige Funktion. Weiterhin sind posttranskriptionelle Effekte des humanen GR beschrieben, wie z.B. Veränderung der mRNA-Stabilität (CHOMCZYNSKI et al., 1986) oder Stimulation des RNA-Transportes (GIGUERE et al., 1986).

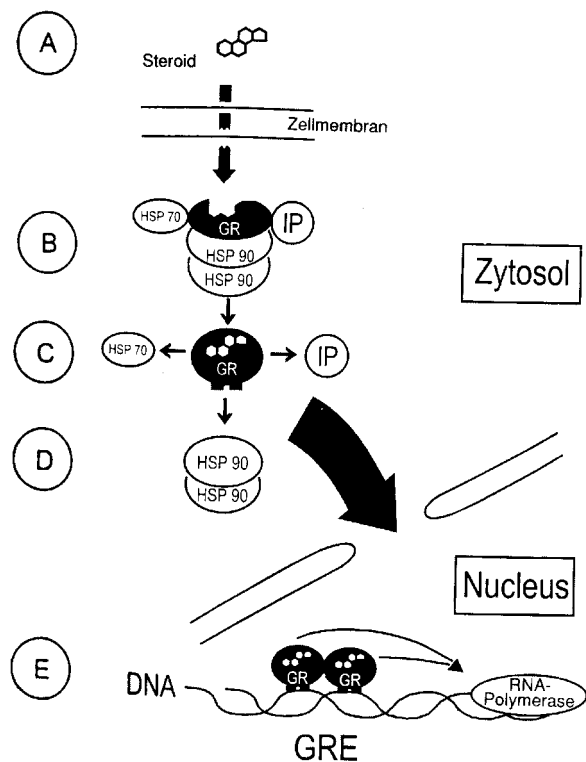


Abb.2: Reaktionskaskade des Glucocorticoidrezeptors.

A=Diffusion des Glucocorticoids in die Zelle. B=Bindung des Steroids an den Glucocorticoidrezeptor, der als Komplex an mehrere Proteine gebunden (HSP90;HSP70 und Immunophyline,IP) im Cytosol vorliegt. C=Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors durch Lösung aus dem Komplex und Konformationsänderung des Glucocorticoidrezeptors. D=Translokation des Rezeptors in den Zellkern. E=Bindung des Glucocorticoidrezeptors als Dimer an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte Glucocorticoid-Response-Elements (GRE), und Aktivierung der Transkription eines glucocorticoid-sensitiven Gens durch Stabilisierung des Transkriptionskomplexes (RNA-Polymerase).
(modifiziert nach Karl & Schulte, 1994)

1.6 Regulation des humanen Glucocorticoidrezeptors

Die Regulation der Menge an funktionsbereitem GR erfolgt wahrscheinlich auf mehreren Ebenen, zum einen transkriptionell (OKRET et al., 1986; KALINYAK et al., 1987; ROSEWICZ et al., 1988), zum anderen posttranskriptionell, wobei der nucleocytoplasmatische Transport, Veränderungen der mRNA-Stabilität (VEDECKIS et al., 1989), variable Effizienz der Translation, die Abbaurate und die Umwandlung einer aktiven

und inaktiven Form des Rezeptors eine Rolle spielen (HÖCK et al., 1989; SVEC, 1990; GUSTAFSSON et al., 1990).

Die Autoregulation durch den Glucocorticoidgehalt in der Zelle konnte mehrfach nachgewiesen werden (SVEC & RUDIS, 1981; VEDECKIS et al., 1989). Nach Verabreichung von Dexamethason an humane und murine Lymphozyten wurde eine Abnahme an hGR-mRNA um 50% verzeichnet (ROSEWICZ et al., 1988; BODWELL et al., 1998). Der aktivierte hGR-Komplex besitzt die Fähigkeit, an die eigene kodierende DNA und mRNA zu binden und somit die hGR-mRNA herunterzuregulieren. Dies geschieht entweder durch Hemmung der Transkription oder durch Herabsetzen der Stabilität und der Translation der hGR-mRNA (BURNSTEIN et al., 1990).

1.7 Ziel und Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Mechanismen zu leisten, die zu einer Glucocorticoid-Resistenz bei Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) führen. Mögliche Ursachen wie Störungen in der Expression und / oder in der Funktion des Glucocorticoidrezeptor (u.a. Signaltransduktion), die zu einer fehlenden Glucocorticoid- und Zytostatika-induzierten Apoptose führen, sollten mit Hilfe von GC-resistenten und sensiblen Zelllinien und Primärzellkulturen von ALL-Patienten untersucht werden.

2. Material

2.1 Antikörper

2.1.1 Primäre Antikörper

Anti-Glucocorticoidrezeptor Kaninchenantikörper (E-20), cat #sc-1003, polyklonal IgG,

Anti-Glucocorticoidrezeptor Kaninchenantikörper (P-20), cat #sc-1002, polyklonal IgG,

Anti-FKBP-52 Ziegenantikörper (C-19), cat #sc-1802, polyklonal IgG

Anti-FKBP-51 Ziegenantikörper (F-13), cat #sc-11514, polyklonal IgG

Anti-HSP90 Mausantikörper, cat #sc-13119, monoklonal IgG_{2a}

Santa Cruz Biotechnology,
USA

Anti-Phosphoserin Mausantikörper, monoklonal

Sigma, Steinheim

Anti-Glucocorticoidrezeptor β Kaninchenantikörper

ABR, INC

Anti-HSP 90 Rattenantikörper, monoklonal

StressGen, Victoria, Kanada

2.1.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen IgG-Meerrettichperoxidase Antikörper

Anti-Ziege IgG-Meerrettichperoxidase Antikörper

Anti-Maus IgG-Meerrettichperoxidase Antikörper

Santa Cruz Biotechnology,
USA

Anti-Ratte IgG-Meerrettichperoxidase Antikörper

Prof. v. Figura, Abt.
BiochemieII, Universität
Göttingen

2.2 Zellen

Humane periphere Blutlymphozyten von Kontrollpersonen wurden aus Vollblut der Blutbank der Universitätsklinik Göttingen gewonnen.

Frische Knochenmarkproben stammen aus der Abt. Hämatologie, Innere Medizin, der Universitätsklinik Göttingen.

Mononukleäre Zellen aus Knochenmark und Blut von ALL-Patienten, die „good-responder“-Zelllinie MHH-ALL-6 (T-ALL) und die „poor-responder“-Zelllinie MHH-ALL-2 (c-ALL) wurden kryokonserviert von Prof. K. Welte, Abt. Kinderheilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Pharmacia, Freiburg, hergestellt.

2.4 Enzyme

DNase 1 Boehringer Mannheim

Restriktionsenzyme

Taq DNA Polymerase Boehringer Mannheim

RNase H

SuperscriptTM II Reverse Transcriptase GIBCO BRL, Eggenstein

2.5 Chemikalien und andere Materialien

Lösungsmittel waren vom Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.a.) und wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

MEGAscriptTM T7 Kit Ambion, Austin, USA

Röntgenfilm Hyperfilm-MP, Hybond ECL, Nylonmembran „Hybond-N“, Radiochemikalien	Amersham, Braunschweig
RNAzol B	AGS, Heidelberg
Ammoniumpersulfat, Proteinassay, TEMED	BioRad, Richmond, USA
Ampicillin, DTT, β -Gal-Staining Set, “Immunoprecipitation Kit (ProteinG)”	Boehringer Mannheim
“Great EscApe™ SEAP Reportersystem”, “Luminescent β -galactosidase Detection Kit”	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Agarose „SeaKem“, “LMP“	FMC BioProducts, Rockland, USA
Trypanblaulösung, Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer, Flüssigmedien: IMDM, AMV, OPTINEM I, Transfektionsreagenz: DMRIE-C, FCS	GIBCO BRL, Eggenstein
“Mycoplasma Removal Agent” Aprotinin, Bromphenolblau, Dodecylsulfat, KCl, Leupeptin, PMSF; NaCl, Na ₂ CO ₃ , NaOH	ICN, Meckenheim Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen, Well-Platten, Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
BSA, EDTA, Tris	Paesel u. Lorei, Hanau
DNA-Bp-Leiter (50/100bp), NAP-5-Säulen	Pharmacia, Freiburg

„CHAPS, Seize™ X Protein G Immunprecipitation Kit“, „BCA Protein Assay Kit“	Pierce, Rockford, USA
Qiaex-DNA-Bandenisolierungskit, RNeasy-Minikit, RNeasy-Midikit, SuperFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Protease-Inhibitoren, Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
Phenol-Chloroform-Lösung, „rotiphorese Gel 30“, „ rotiphenol“ Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll-Lösung, PBS-Dulbecco ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ RPMI 1640	Seromed, Berlin
Gel-Slick™	Serva, Heidelberg
Acrylamid, Bromphenolblau-Xylenxyanol, DEPC, DMSO, Chloroquine, DEAE-Dextran, Dexamethason, Geneticin, Guanidinthiocyanat, HEPES, Na ₂ HPO ₄ , Mineralöl, Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
2.6 Geräte	
UV-Transilluminator 302nm, Vakuum Konzentrator	Bachhofer, Reutlingen
GPR Zentrifuge, Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann, München
Gelkammer „Agagel Maxi“, Geltrockner, Thermocycler „Trio-Thermoblock“	Biometra, Göttingen

Semi-dry-Elektroblot-Kammer, Minigel-Kammer	BioRad, München
Zentrifuge 5436	Eppendorf, Hamburg
Minifuge GL, Brutschrank Typ 6060	Heraeus GmbH, Osterode
Zentrifuge „Universal 16R“	Hettrich, Tuttlingen
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA-Werk, Staufen i. Br.
UV-Tisch 312nm mit Videodokumentation	INTAS, Göttingen
Wasserbad RM20	mgw Lauda, Lauda-Königshofen
Sterilbank „Flow Gelaire“	Opera, Italien
Netzgerät, Spectrophotometer	Pharmacia, Freiburg
Tischzentrifuge	Qualitron, Korea
pH-Meter CG820	Schott, Hofheim a. Ts.
Gelkammer „Blue Vertical 160C“, Hybridisierungsöfen HB 400 C	Serva, Heidelberg
Inverses Mikroskop	Zeiss, Jena
Luminometer LB953	Berthold, Pforzheim

3. Methoden

3.1 Präparation und Analyse von DNA

3.1.1. Reinigung und Konzentrierung von DNA

3.1.1.1 Reinigung durch Phenolisierung und Alkohol-Präzipitation

Zur Abtrennung von Proteinen aus DNA-Lösungen wurde eine Extraktion mit Phenol-Chloroform durchgeführt (SAMBROOCK et al., 1989; WALLACE, 1987), gefolgt von einer Ethanol-fällung. Zu der DNA-Lösung wurde ein Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) gegeben, durch Schwenken der Gefäße gut durchmischt und anschließend durch Zentrifugation (7000x g, 5min, RT) eine erneute Phasentrennung erreicht. Die wässrige Phase wurde abgenommen und zur Entfernung von Phenolresten mit einem Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) extrahiert.

Zur Alkohol-fällung wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetatlösung (pH 5,2) und 2,5fachem Volumen Ethanol (96%, v/v, -20°C) versetzt. Die DNA wurde 30 min bei -80°C oder mindestens 2 Stunden bei -20°C gefällt und anschließend durch Zentrifugation (16000x g, 4°C, 25min) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, getrocknet und in einem gewünschten Vol. Wasser oder TE-Puffer aufgenommen. In einigen Fällen wurde eine Fällung mit 0,7 Vol. Isopropanol durchgeführt, die DNA aber anschließend wie nach Ethanol-fällungen behandelt.

3.2 Isolierung von DNA

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Eine einfache und schnelle Methode hochreine Plasmid-DNA zu isolieren, ist mit der Anwendung der Qiagen Plasmid Kits (Qiagen, Hilden) gegeben. In „Mini“-„Midi“- oder „Maxi“-Präparationen können Plasmide aus Bakterienkulturen von 1-500 ml isoliert werden.

Das Aufschlußverfahren basiert auf einem modifizierten alkalischen Aufschluß (BIRMBOIM et al., 1979). Die Reinigung der Plasmid- DNA erfolgt nach Proteinfällung durch SDS/NaOH und Kaliumacetat über die „Qiagen-Säule“.

Die Plasmidreinigung erfolgte nach dem vom Hersteller angegebenen Protokollen. Je nach verwendeter Qiagen-Säule wurde ein entsprechendes Volumen Bakterienkultur bis zur Sättigung bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation gesammelt und in entsprechendem Volumen Puffer P1 aufgenommen. Der Bakterienaufschluß erfolgte durch Zugabe von Puffer P2. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde Puffer P3 kalt zugegeben und der Ansatz auf Eis für 20 Minuten inkubiert. In der sich anschließenden 30minütigen Zentrifugation (30000 x g, 4°C) präzipitierten die Proteine, so daß der Plasmid-überstand auf die Säule geladen werden konnte. Zuvor wurde die Qiagen-Säule mit Puffer QBT voräquilibriert. Es wurde 2x mit Puffer QC gewaschen, danach die DNA mit Puffer QF eluiert, mit 0,7 Vol Isopropanol bei -20°C gefällt und 30 Minuten bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE aufgenommen

Puffer P1	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 400 µg/ml RNase A
Puffer P2	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer P3	2,55 M Kaliumacetat pH 4,8
Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS pH 7,0 oder Tris/HCl pH 7,0 15% Ethanol
Puffer QC	1000 mM NaCl 50 mM MOPS pH 7,0 oder Tris/HCl pH 7,0 15% Ethanol
Puffer QF	1200 mM NaCl 50 mM MOPS pH 8,0 oder Tris/HCl pH 7,0 15 % Ethanol

3.2.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Das Protokoll (Qiagen-Gel-Extraction-Kit) war geeignet für die Isolierung von 50 bp bis 50 kb DNA-Fragmenten aus 0,3 bis 2%igen Agarosegelen. Unter UV-Licht wurde die DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Gelstück wurde mit 300 µl Solubilisierungslösung QX1/100 mg Gel versetzt. Bei DNA-Mengen bis 10 µg wurden 30 µl der Glasperlensuspension QIAEX II zugefügt. Die Gelsolubilisierung und DNA-Adhäsion fand unter leichtem Schütteln bei 50°C für 10 Minuten statt. Anschließend wurde für 30 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert und das Pellet je 1x mit 500 µl QX-I-Puffer und 2x mit 500 µl PE-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde dabei jedesmal zwischen den Waschschritten mit der Pipette vorsichtig resuspendiert und danach 5 Sekunden abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschriff wurde das Pellet 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend erfolgte die Elution der DNA durch Zugabe von 20 µl TE-Puffer bei Raumtemperatur. Die QIAEX-Glasperlen wurden durch Zentrifugation (30 Sekunden 12000 rpm) entfernt und der Überstand vorsichtig abgenommen. Erfahrungsgemäß lag die Ausbeute mit diesem Kit bei 20-40%.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Je nach Molekulargewicht der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 1%ige Agarosegele für DNA Restriktionsfragmente und 2,5%ige Agarosegele für die Auftrennung von PCR-Produkten verwendet. Nach Einwiegen der entsprechenden Agarosemenge in 1x TBE-Laufpuffer wurde die Suspension im Mikrowellenherd kurz aufgeköcht und nach Abkühlen auf 55°C mit Ethidiumbromid-Lösung (20 mg/ml in H₂O_{bid.}) zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Die DNA in wässriger Lösung wurde mit einem 1/10 Volumen Auftragslösung versetzt und auf das Gel geladen. Für die Elektrophorese, ebenfalls in 1x TBE-Puffer, wurden Spannungen von 5-10 V/cm verwendet. Die DNA wurde durch UV-Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids bei 366 nm sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Auftrennung sehr geringer DNA-Fragmentdifferenzen (60 Basenpaare) wurden Gele mit 2,5% Sea Kem[®]/Agarose verwendet.

10x TBE-Puffer	110 g Tris 55 g Borat 40 ml 0,5M EDTA; 8,0 ad 1000 ml H ₂ O
10x Auftragslösung	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 60% Glycerin in H ₂ O

3.3 Enzymatische Behandlung von DNA: Restriktionsanalyse

Mit Restriktionsendonukleasen werden Plasmide und chromosomale DNA sequenzspezifisch geschnitten. Die Reaktion erfolgte in einem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem, das in der Regel als 10fach konzentrierte Stammlösung mitgeliefert wurde und bei einer für das jeweilige Enzym idealen Temperatur von 1-3 h in einem Wasserbad bzw. Thermoblock. Die Enzyme wurden bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Je nach Enzym wurden 3-5 U/μg DNA eingesetzt (1U ist als die Aktivität definiert, die 1μg λ-DNA in einer Stunde vollständig schneidet). Da der Lagerungspuffer der Enzyme zum Teil 50% Glycerin enthielt, war beim enzymatischen Verdau von DNA darauf zu achten, daß die Enzymlösung 0,1 Vol. des Ansatzes nicht überschritt. Eine Glycerinkonzentration oberhalb von 5% kann zu unspezifischem Schneiden oder zu Hemmung der Enzymaktivität führen (FUCHS & BLAKESLEY, 1983). Für „Doppolverdaus“ wurden entweder Enzyme verwendet, die den gleichen Puffer benötigen, oder es wurde zunächst die Verdauung im Puffer mit geringerer Salzkonzentration durchgeführt, für das zweite Enzym wurde anschließend die Salzkonzentration erhöht. Die Ansätze wurden mithilfe von Agarosegelen überprüft.

3.4 Amplifikation von cDNA-Fragmenten durch PCR

Die Methode der enzymatischen Amplifikation von DNA-Regionen unter Verwendung spezifischer Polymerisationsstarter („Primer“) wurde von SAIKI et al. (1985) entwickelt. Durch die Verwendung der thermostabilen Taq-Polymerase (SAIKI et al., 1988) konnte die Methode vereinfacht und automatisiert werden. Die PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) erlaubt die selektive Anreicherung einer gewählten DNA-Region in einem einzigen Reaktionsablauf und schafft ein spezifisches DNA-Fragment, das für ein weites Spektrum nachfolgender Analysen verwendet werden kann. Die PCR verwendet zwei synthetische Oligonukleotide, die spezifisch an je einem Ende der zu untersuchenden DNA-Region hybridisieren („Annealing“) und als Primer für die DNA-Synthese durch die thermostabile Polymerase dienen. Die PCR besteht aus drei Schritten:

- 1) Hitzedenaturierung der DNA
- 2) „Annealing“ der Primer
- 3) Polymerisationsreaktion

Wiederholte Zyklen dieser drei Schritte resultieren in einer exponentiellen Amplifikation, da die Polymerisationsprodukte des vorherigen Zyklus als zusätzliche DNA-Templates im nächsten Zyklus dienen.

Im folgenden ist ein typischer Reaktionsansatz für die Amplifizierung eines cDNA-Fragments aufgeführt:

250-500 ng cDNA
0,8 μ M je Primer
0,1 mM je dNTP
1/10 Volumen 10 x Taq-Puffer (100mM Tris-HCl, 500mM KCl,
15mM MgCl₂; pH 8,3)
1 Unit Taq-Polymerase
H₂O_{bid.} ad Endvolumen von 25 μ l

Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler (TRIO-Thermoblock, Biometra) durchgeführt, deren Reaktionsbedingungen wurden wie folgt gewählt wurden:

1) Denaturierung: 94°C, 3Minuten

„hot-start“: Zugabe der Taq-Polymerase

Denaturierung: 94°C, 1Minute

2) „Annealing“: Die „Annealing“-Temperatur wurde durch Abschätzen der Schmelztemperatur der Oligonukleotide eingestellt. Als Faustregel wurde für jede A/T-Paarung 2°C, für jede G/C-Paarung 4°C berechnet (THEIN & WALLACE, 1986).

Von SUGGS et al. (1981) wurde folgend beschriebene Formel zugrundegelegt:

$$T_m = 4x (G+C) + 2x (A+T)$$

Die Schmelztemperatur der Primer hängt nicht nur von der Basenzusammensetzung, sondern auch von vielen anderen Parametern, wie der Verteilung der G- und C-Nukleotide innerhalb des Oligonukleotids, der Ionenstärke der Lösung ab. Die optimale Annealingtemperatur muß deshalb experimentell ermittelt werden. Prinzipiell sollte das Annealing bei höchst möglicher Temperatur (hier zwischen 60 und 65°C) und möglichst kurzer Zeitspanne (gewöhnlich 30 Sekunden) vorgenommen werden.

3) Polymerisationsreaktion: 72°C, je nach Länge des zu synthetisierenden Fragments (1min).

Die Anzahl der Reaktionszyklen hängt von der Menge der eingesetzten DNA, der Spezifität der Primer und der gewünschten Menge an amplifizierter DNA ab. Gewöhnlich wurde die PCR in 30 Zyklen durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden nach Ende der Reaktion durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.5 Präparation und Analyse von RNA

Ein großes Problem beim Umgang mit RNA sind Kontaminationen mit Ribonukleasen. RNasen sind sehr stabile Enzyme, die im allgemeinen keine Kofaktoren benötigen. Die meisten RNasen werden durch alleiniges Autoklavieren nicht inaktiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden wurde folgendes beachtet:

Das $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ für die zur RNA-Präparation benötigten Lösungen wurde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikationen. Das $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ wurde mit 0,2% (v/v) DEPC unter starkem Schütteln behandelt. Das H_2O wurde anschließend autoklaviert um das restliche DEPC zu entfernen. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden, soweit möglich, autoklaviert bzw. steril filtriert. Beim Umgang mit RNA wurden prinzipiell Handschuhe getragen und sterile Einwegpipetten benutzt.

3.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA

3.5.1.1 Guanidinium/Phenol-Chloroform-Methode

Ein modifiziertes Protokoll von CHOMZYNSKI & SACCHI (1987) wurde zur Isolierung von Gesamt-RNA aus mononukleären Zellen von peripheren Blut und Knochenmark verwendet. Die Methode kombiniert Guanidinium- und Phenol/Chloroform-Extraktion in einer Prozedur unter Umgehung der CsCl-Gradienten-Ultrazentrifugation. Auf diese Weise kann innerhalb weniger Stunden die Gesamt-RNA aus einer großen Anzahl Proben isoliert werden. Die mononukleären Zellen wurden, wie in Methode 3.8.4. beschrieben, isoliert, pelletiert und in 5 Vol. RNAzol (Biotecx lab., USA) lysiert, gemischt, mit 1/10 Vol. Chloroform versetzt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden zur Phasentrennung in einer geeigneten Zentrifuge für 15 Minuten bei maximaler Drehzahl und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Isopropanol versetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei -20°C , an die sich eine 15 minütige Zentrifugation bei 4°C und 15.000 rpm anschloss. Zum Entsalzen wurde das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gelöst.

3.5.1.2 Gesamt-RNA-Isolierung über Silikagel-Membran

Mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (RNeasyTM, Qiagen, Hilden) konnte aus kleineren Zellmengen innerhalb von einer Stunde über hydrophobe Wechselwirkungen Gesamt-RNA isoliert werden. Bis zu 1×10^7 mit PBS gewaschener Zellen wurden mit 350 μl Lysispuffer (RLT) versetzt und mehrmals mit einer 10 ml-Spritze durch eine Kanüle mit

0,6 mm Durchmesser gezogen, um die chromosomale DNA mechanisch zu scheren. Das Homogenat wurde auf eine „RNeasy-Säule“ geladen und für 30 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Die Nukleinsäuren hefteten sich durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Silika-Gel-Membran der Säule, das Eluat wurde verworfen. Mit 700 µl Puffer RW1 wurde die Säule gewaschen und erneut zentrifugiert, so dass Lysispufferreste entfernt wurden. Daraufhin wurde die Säule 2x mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen, beim 2. Waschschrift wurde die Säule durch schnelles Zentrifugieren getrocknet (14000 rpm, 2 min). Abschließend eluierte man die RNA mit 40µl H₂O_{DEPC} und bestimmte die Konzentration mittels Spektralphotometer nach folgender Formel:

$$1\text{OD}_{260} = 40\mu\text{g RNA/ml}$$

Um für weitere Analysen DNA-Kontaminationen auszuschließen, behandelte man das Eluat für 1h bei 37°C mit einer RNase freien DNase.

Reaktionsansatz:

DNase 1-Verdau:	Gesamt-RNA-Lsg.	40µl
	10 x Taq-Puffer	8,0µl
	DTT	4,0µl (0,1 M)
	DNase 1	3,0µl
	RNAguard	1,0µl
	H ₂ O _{DEPC}	21,0µl

Nach der enzymatischen Behandlung erfolgte eine Phenol-Chloroformextraktion, die wässrige Phase wurde mit 1/10 Vol Natriumacetat (3 M, pH 4,8) und 2,5 Vol Ethanol (96%) bei -20°C für mindestens 2 h gefällt. Zum Entsalzen wurde das durch Zentrifugation erhaltene Pellet mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl H₂O_{DEPC} gelöst. Die RNA-Lösung wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

3.5.2 Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA und aus in-vitro-transkribierter RNA

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus Gesamt-RNA wurde mit M-MLV reverser Transkriptase (Superscript II, Gibco BRL) durchgeführt. Die isolierte, mit Ethanol oder Isopropanol gefällte RNA wurde dazu in $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gelöst und mit einem genspezifischen Primer für 10 min bei 70°C denaturiert. Nach 2minütigem Abkühlen auf Eis wurde folgender Ansatz zusammengegeben:

Primer(10pmol/ μl)	2,0 μl
denat.RNA (200-500ng)	9,0 μl
5x RT-Puffer	4,0 μl
0,1 M DTT	2,0 μl
10 mM dNTPs	1,0 μl
RNase Inhibitor (40U/ μl)	1,0 μl
Reverse Transkriptase (RT)	1,0 μl

Dieser Ansatz wurde 1,5 h bei 42°C inkubiert und anschließend 15 min bei 70°C inaktiviert. Wurde das Template für eine Amplifikation mittels PCR verwendet, behandelte man den Ansatz mit 1 Unit RNase H für 1 h bei 37°C , um RNAs, die eventuell die PCR behindern könnten, zu eliminieren.

3.6 RNA-Synthese: In-vitro-Transkription

Mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (Megascript™, Ambion) konnte innerhalb weniger Stunden aus $1\mu\text{g}$ DNA-Template $120\mu\text{g}$ RNA synthetisiert werden. Ausgangsmaterial war ein 314 bp großes, über PCR amplifiziertes cDNA-Fragment des hGR mit T7-Polymerase-Bindungsstelle. Die synthetisierte RNA wurde später als interner Standard für die quantitative, kompetitive RT-PCR benötigt.

Folgender Reaktionsansatz wurde 4 h bei 37°C inkubiert:

DNA-Template ($1\mu\text{g}$)	8 μl
10 x Transkriptionspuffer	2 μl
ATP-Lsg	2 μl

CTP-Lsg	2 µl
GTP-Lsg	2 µl
UTP-Lsg	2 µl
Enzym-Mix (T7-RNA-Polymerase)	
RNase-Inhibitor, 50% Glycerol)	2 µl

Nach Ende der Transkriptionsreaktion wurde das DNA-Template mit 2 U DNase 1 (RNase-frei) in 45 Minuten bei 37°C degradiert. Um die enzymatische Reaktion abzustoppen, wurde das Reaktionsvolumen auf 135 µl H₂O_{DEPC} erhöht, der Ansatz mit 15 µl Ammoniumacetat-Stopplösung versetzt und gemischt. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Isopropanolfällung der wässrigen Phase für mindestens 2 h bei -20°C. Nach Zentrifugation wurde das RNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert, getrocknet und in H₂O_{DEPC} gelöst.

3.7 Biochemische Methoden

3.7.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt einer Lösung kann nach einer von BRADFORD (1976) entwickelten Methode mit dem sog. Bio-Rad-Proteinassay gemessen werden. Der Nachweis beruht darauf, daß das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung Coomassie Brilliant Blue nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Die Analysen können im Bereich von 0,2 bis 1,4 mg Protein/ml (Standardmethode) bzw. 1-25 µg/ml (Mikromethode) durchgeführt werden.

Zunächst wurde eine Eichkurve mit einem Protein bekannter Konzentration (BSA) erstellt. 2-20 µg BSA wurden in 1 Vol. von 0,8 ml 250 mM TRIS-HCl mit 0,2 ml Farblösung (Biorad-Reagenz) gemischt. Nach 5-30 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm gegenüber dem Leerwert (0,8 ml 250 mM TRIS-HCl + 0,2 ml Farblösung) bestimmt. Mit den jeweiligen Proteinproben wurde analog verfahren und deren Proteinkonzentration aus der Eichgerade abgelesen.

3.7.2 Auftrennung von Proteinen mit SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Proteine wurden mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Trenngellösung wurde nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei durch 1,0 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Überschichten mit Isopropanol lässt man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren. Danach dekantiert man das Isopropanol und giesst das Sammelgel direkt auf das Trenngel. Nach Einsetzen eines Kamms lässt man das Sammelgel in vertikaler Lage polymerisieren. Anschließend wurde das Gel in eine Vertikalapparatur eingespannt und die Reservoirs mit Laufpuffer gefüllt. Die Proteinlysate wurden mit 4x Ladepuffer (Roth) versetzt, 5 min bei 100°C denaturiert und nach Entfernen des Kamms in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 Volt, ein Proteinmarker (Rainbow-Marker, Amersham) wurde zur Größenbestimmung mitgeführt. Nach ca. 1,5 h wurden die Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt, das Gel mit den Proteinen entweder mit Coomassie oder Ponceau S-Lösung gefärbt oder die Proteine mittels Elektroblob auf eine PVDF-Membran übertragen.

Trenngel-Lösung: 6-15% Acrylamid; 0,16-0,4% N,N'-Methylenbisacrylamid;
350 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED

Sammelgel-Lösung: 5% Acrylamid; 0,13% N,N'-Methylenbisacrylamid; 125mM Tris-HCl
pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED

Laufpuffer: 25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1% SDS

3.7.3 Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE

Proteine, die durch eine SDS-PAGE aufgetrennt werden, können durch Farbstoffe wie Coomassie-Blau oder Ponceau S sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel für mind. 30 min in 0,5 ml/cm² Gelfläche Färbelösung inkubiert und danach solange entfärbt, bis die Proteinbanden gut zu erkennen waren.

Coomassie-Lösung: 0,2% Coomassie-Brilliant-Blau; 50% Methanol; 7,5% Essigsäure

Ponceau-S-Lösung: 0,1% Ponceau S; 30% Methanol; 15% Essigsäure

Entfärbe-Lösung: 50% (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

3.7.4 Western-Blot-Analyse

Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden sind, wurden mit einer „Semi dry“-Elektroblot-Kammer (BioRad, München) auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde das Gel zusammen mit einer in Methanol äquilibrierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen je drei Lagen mit Transferpuffer getränktem 3MM Whatman-Papier gelegt. Die Elektroden umschlossen das „Sandwich“ und der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/ cm² Membranfläche für 1h.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h in 5% fettfreier Milch in TBS bei Raumtemperatur geschwenkt und anschließend über Nacht mit dem Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen oder einer empirisch ermittelten Verdünnung) in 5% BSA bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 min in TBST gewaschen und danach 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper (in der vom Hersteller empfehlenden Verdünnung) in 5% fettfreier Milch in TBS (0,1 ml/cm² Membranfläche) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBS wurden die Proteine, die vom Antikörper erkannt worden sind, sichtbar gemacht. Die verwendeten Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper konnten mit dem ECL-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) detektiert werden. Dafür mischt man zwei ECL-Lösungen im Verhältnis 1:1 und bedeckt damit für 5 min die Membran vollständig. Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen und in einer Kassette gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeiten lagen zwischen 10 sec. und 15 min und richteten sich nach der Expressionsstärke des Proteins.

Transferpuffer: 48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% Methanol

TBS: 20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,5

TBST: TBS + 0,1% Tween 20

3.7.5 Immunpräzipitationen

Immunpräzipitationen wurden unter Verwendung von Protein G-Agarose (Roche, Mannheim) durchgeführt. Das aus Bakterienzellwänden isolierte Protein G besitzt eine hohe Affinität zum Fc-Teil von Antikörpern. Durch an Protein G gebundene Antikörper kann ein Antigen aus einer Lösung, z.B. einem Zellsolubilisat, gebunden und isoliert werden.

Für die Herstellung der Proteinextrakte wurden 5×10^6 - 1×10^7 Zellen von der „good-responder“-Zelllinie MHH-ALL-6 und „poor-responder“-Zelllinie MHH-ALL-2 verwendet. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml CHAPS-Lysis-Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis lysiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation ($500 \times g$, 5 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand, in dem sich die Proteinkomplexe befanden, wurde mit 50 μl Protein G-Agarose für mindestens 3 h bei 4°C unter Schütteln vorinkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu immobilisieren und somit zu eliminieren. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei $12000 \times g$ für 20 s, das dabei entstehende Pellet mit unspezifisch gebundenen Proteinen wurde verworfen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 5 μl spezifischen Antikörper (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt und für 1 h bei 4°C unter Schütteln vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 μl Protein G-Agarose und eine Inkubation für mindestens 3 h bei 4°C in einem über Kopf rotierenden Schüttler. Die entstandenen Protein-Antikörper-ProteinG-Agarose-Komplexe werden für 20 s bei $12000 \times g$ sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Sediment mit den präzipitierten Proteinen wurde in 1 ml Wasch-Puffer1 aufgenommen und für 20 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Zentrifugation ($1200 \times g$, 20 s) wurde das Sediment erneut in 1 ml Waschpuffer 1 aufgenommen, für 20 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in 1 ml Waschpuffer 2, einem Hochsalzpuffer, aufgenommen und für 20 min bei 4°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Immunkomplexe wurden im letzten Waschschrift mit 1 ml eines Niedrigsalz-Puffers, dem Waschpuffer 3, wie zuvor behandelt und konnten dann mit 25-75 μl SDS-Probenpuffer hitzedenaturiert, erneut zentrifugiert und zur Elektrophorese auf das SDS-PAGE-Gel geladen werden.

CHAPS-Lysis-Puffer: 2% CHAPS; 50 mM Hepes, pH 7,4; 200mM NaCl; 1 mM Benzamidin; Protease-Hemmer-Mix (Chymostatin, Leupeptin, Antipain, Pepstatin)

Waschpuffer1:	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% SDS; Protease-Hemmer-Mix
Waschpuffer2:	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,1% NP-40; 0,05% SDS
Waschpuffer3:	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1% NP-40; 0,05% SDS
SDS-Probenpuffer:	125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 30% Glyzerin; 4% SDS; 0,002% Bromphenolblau; 2% Mercaptoethanol vor Gebrauch zugeben

3.8 Zellbiologische Methoden

3.8.1 Reaktivierung von Zellkulturen

Eingefrorene Zellkulturen wurden zur Reaktivierung im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, schnell mit 10 ml auf 37°C vorgewärmtem Kulturmedium gemischt, in Zellkulturschalen überführt und bei 37°C in einer Atmosphäre aus 5% CO₂ und 95% Luft kultiviert.

3.8.2 Kryokonservierung von Zellen

$1-2 \times 10^7$ Zellen wurden sedimentiert und anschließend in 10% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid), 20% (v/v) FCS und 70% Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen bei -20°C langsam abgekühlt und mehrere Tage bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

3.8.3 Suspensionszellkultur

Zelllinien und Primärzellen wuchsen in Suspension und wurden in IMDM-Medium (+10% FCS) in einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml Medium bei 37°C in einer Atmosphäre aus 5% CO₂ und 95% Luft gehalten.

3.8.4 Isolierung von mononukleären Zellen (Lymphozyten und Lymphoblasten)

Unter Ausnutzung der unterschiedlichen Dichten der verschiedenen Blutzellen wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation mononukleäre Zellen gewonnen. Mit EDTA versetztes Vollblut oder Knochenmark wurde mit 1 Vol. PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) verdünnt. 30 ml dieses Gemisches wurden über 12 ml Ficoll-Paque (Dichte=1,077) in einem 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen (oder 10 ml über 4 ml in einem 15 ml Röhrchen) geschichtet. Anschließend wurde 25 Minuten bei 850 x g zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten wandern durch das Ficoll, während Monozyten (Dichte ca. 1,068), Lymphozyten (Dichte ca. 1,077) und Thrombozyten (Dichte ca. 1,063) sich in der Interphase ansammeln. Die Zellen in der Interphase wurden vorsichtig abgezogen und 1 x für 10 Minuten mit PBS bei 850 x g vom restlichen Ficoll befreit. Im Fall von Erythrozytenbeimengungen wurde diese durch Aufnahme des Pellets in Erythrozytenlysispuffer und 5 minütigem Platzieren auf Eis lysiert und anschließend in PBS gewaschen (5 Minuten bei 478 x g). Danach wurde 3 x je 7 Minuten bei 136 x g zentrifugiert, bis die Thrombozyten herausgewaschen waren. Anschließend wurden die Zellen zur RNA- oder Proteinisolierung weiterverarbeitet.

Erythrozytenlysispuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH 7,4
PBS-Puffer (Dulbecco) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	8000 mg/l NaCl 200 mg/l KCl 1150 mg/l NaH ₂ PO ₄ 200 mg/l KH ₂ PO ₄ 100 mg/l MgCl ₂ x 6H ₂ O 100 mg/l CaCl ₂

3.8.5 Lebendzellzahlbestimmung durch Trypanblaufärbung

Tote Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau auf, lebende dagegen schließen ihn aus und erscheinen im Mikroskop farblos. Nach dem Waschen der Zellen wurde ein Aliquot der Zellen im Verhältnis 1:1 mit Trypanblaulösung vermischt und kurz inkubiert. Die Anzahl ungefärbter lebender Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer durch Auszählen aller 16 c-Felder bestimmt. Die Zellzahl/ml wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

Trypanblaulösung	0,25% Trypanblau 0,15 M NaCl
------------------	---------------------------------

3.8.6 Internalisierungsexperimente mit ³H-markiertem Dexamethason

Um zu untersuchen, ob „good“- und „poor-responder“- Zelllinien unterschiedlich Glucocorticoide aufnehmen, wurden exemplarisch zwei Zelllinien ³H-markiertes Dexamethason angeboten.

Hierzu wurden je 5×10^6 Lymphoblasten dreimal mit PBS gewaschen und mit 20 nM ³H-markiertem Dexamethason in einem Zeitraum von 10 bis 120 min bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Durch Zugabe von 100-fachem Überschuss von unmarkiertem Dexamethason konnte eine unspezifische Hormonbindung determiniert werden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, zentrifugiert und in 100 µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit überführt, vermischt und im β-Zähler des Szintillationsgerätes gemessen.

3.8.7 Transiente Transfektion von leukämischen Zellen

Kationische Lipide und Helferlipide (z.B. DMRIE-C, GIBCO BRL) binden über ionische Wechselwirkungen mit der Liposomenoberfläche DNA und sind so für eine effiziente Aufnahme von DNA in die Zelle verantwortlich. Es wurden „good“- und „poor-responder“- Zelllinien und 16 Primärzellkulturen von ALL-Patienten („good“- und „poor-responder“) mit

dem Plasmid GRE-SEAP transient transfiziert, dass das Glucocorticoid-Responsive-Element (GRE) besitzt, welches mit dem Reporter gen, der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP), fusioniert ist.

Die leukämischen Zellen wurden auf 5×10^6 Zellen/ml (Lebendzellzahl) mit serumreduziertem OPTI-NEMI-Medium (GIBCO BRL) eingestellt. Eine 24-Loch-Platte wurde mit 100 μ l OPTI-NEMI-Medium pro Loch beladen. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 1,2 μ l DMRIE-C-Reagenz/Loch. Nach vorsichtigem Mischen der Reagenzien wurde die Platte bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. In dieser Zeit wurde die zu transfizierende Plasmid-DNA-Lösung auf 1,2 μ g Plasmid in je 100 μ l OPTI-NEMI-Medium vorbereitet. Nach Beendigung der Inkubation wurde dieses Plasmid-Medium-Gemisch in jedes Loch (bis auf die Kontrollansätze) gegeben, vorsichtig gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 40 μ l der Zellsuspension (5×10^6 Zellen/ml) in jedes Loch auf die vorliegenden Lipid-DNA-Komplexe pipettiert und bei 37°C im Brutschrank (5% CO₂-Atmosphäre) für 4 h inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe von jeweils 400 μ l IMDM-Medium+15% FCS bzw. serumfreies AMV-Medium (GIBCO BRL). Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die serumfrei gehaltenen Zellen mit Dexamethason (1×10^{-9} M) induziert. Parallel erfolgten Transfektionen mit pGRE-SEAP ohne Dexamethasoninduktion als Negativkontrolle, deren Reporter gen-Aktivität wurde als Hintergrundaktivität gewertet und subtrahiert und Transfektionen mit dem Plasmid pSEAP2-Control (Clontech) als Positivkontrolle. Die Ernte aller Zellen erfolgte nach 60 h, nach dieser Zeit wurde das Reporter gen am stärksten exprimiert und ins Medium sezerniert.

3.8.8 Reporter genanalyse

Nach Aktivierung des GRE, das fusioniert mit einem Thymidinkinase-Promotor im Plasmid vorliegt, wird als Reporter gen die sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP) exprimiert und kann über eine Chemilumineszenzmessung nachgewiesen und quantifiziert werden. Der Nachweis wurde mit dem „Great Escape™ SEAP Reportersystem“ der Firma Clontech erbracht. Pro Versuch benötigte man 15 μ l Zellüberstand, der durch einen Zentrifugationschritt von ca. 100 μ l Zellkultur gewonnen wurde. Die 15 μ l Probe wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 45 μ l 1xVerdünnungspuffer (Clontech) vermischt. Die

Probe wurde für 30 min bei 65°C in einem Wasserbad inkubiert, danach für 3 min auf Eis abgekühlt und bei Raumtemperatur äquilibriert. 60 µl Assay-Puffer (Clontech), der den Phosphatase-Inhibitor L-Homoarginin enthielt, wurde zur Probe hinzugegeben und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Substrates, 1 Volumenteil 25 mM CSPD wurde mit 19 Volumenteil Chemilumineszenz-Enhancer verdünnt und 60 µl dieser Verdünnung wurde zu dem Probenansatz gegeben. Nach einer 10 min Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Messung in einem Zeitraum bis zu 1 h erfolgen. Es wurden Dreifachansätze gewählt und nach der Messung im Luminometer der Mittelwert gebildet.

3.8.9 X-Gal Färbung

Mithilfe der X-Gal Färbung kann eine β -Galaktosidase-Expression in Zellen nachgewiesen werden. Die Zellen wurden hierfür mit dem Plasmid β -gal Control (Clontech), welches β -Galaktosidase als Reportergen besitzt, transient transfiziert (s. Methode 3.8.7.). Zur Durchführung der X-Gal Färbung wurden die transfizierten Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend 15 min bei Raumtemperatur mit 0,5 ml Fixierungslösung inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS, worauf die Zellen bis zu einer Woche bei 4°C in PBS gelagert oder direkt angefärbt werden konnten. Zur Anfärbung wurden die Zellen in 0,5 ml Färbelösung aufgenommen und in eine 24-Loch-Platte überführt. Die Farbentwicklung erfolgte bei 37°C im Brutschrank für 0,5-3 h und wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt.

Fixierungslösung	Formaldehyd, 37%ig (w/v)	540 µl
	Glutaraldehyd, 25%ig(w/v)	80 µl
	PBS	ad 10 ml

Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch hergestellt.

Färbelösung	X-Gal-Stammlösung	0,5 ml
	K ₃ Fe(CN) ₆	1,32 g
	K ₄ Fe(CN) ₆ x3H ₂ O	1,69 g
	PBS	9,3 ml
	MgCl ₂ , 200mM	0,1 ml

Lagerung bei -20°C. X-Gal und MgCl₂ wurden direkt vor Gebrauch zugesetzt.

3.9 Statistische Methoden

Die durchgeführten statistischen Berechnungen nach der Reporteranalyse (s. 3.8.8) erfolgten mit dem EDV-Programm Statistica, Version 6.0.

Die Signifikanztestung (z.B. SEAP-Expressionen bei good- und poor-respondern) erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Testes.

Gruppendifferenzen wurden als signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% lag ($p < 0,05$). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 1\%$ ($p < 0,01$) wurden die Differenzen als hoch signifikant gewertet.

Die Berechnung der Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen erfolgte gemäß den üblichen statistischen Methoden.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung der quantitativen, kompetitiven RT-PCR

Zunächst soll geklärt werden, ob das unterschiedliche Ansprechen kindlicher ALL auf GC-Therapie auf verschiedene Mengen an Glucocorticoidrezeptor in den Lymphoblasten zurückzuführen ist.

Zur Quantifizierung der hGR-mRNA in Lymphozyten und Lymphoblasten kommt als Methode die kompetitive RT-PCR zum Einsatz, die im Rahmen einer Diplomarbeit speziell für den hGR etabliert wurde (HENNIG, 1997). Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurde ein verkürztes Fragment der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des hGR als interner Standard hergestellt, das die gleichen Primerbindungsstellen wie die Zielsequenz besitzt und in der PCR mit dieser um die Primerbindung konkurriert.

Der interne Standard wurde als Kompetitor in unterschiedlichen Konzentrationen in einer quantitativen RT-PCR eingesetzt, um eine Quantifizierung der mRNA in den zu untersuchenden Patientenproben zu ermöglichen.

Verwendete Primer:

GR-LBD_{sense}

5'- CTCACCCCTACCCTGGTGTCA -3'

GR-LBD_{antisense}

5'- CATTGGTCGTACATGCAGGGTA -3'

In verschiedenen Reaktionsansätzen wurde jeweils die gleiche Menge Gesamt-RNA aus mononukleären Zellen von ALL-Patienten bzw. gesunden Kontrollpersonen mit abnehmenden Mengen an interner Standard-RNA zusammen in einem Reaktionsgefäß revers transkribiert und anschließend RNaseH behandelt. 1/10 Vol. des cDNA-Ansatzes wurde in einer PCR, unter optimierten Reaktionsbedingungen, mit dem Primerpaar (GR-LBD_{sense}, antisense) amplifiziert.

Da die Zielsequenz und der interne Standard unter identischen Bedingungen mit gleicher Effizienz koamplifiziert werden (HENNIG, 1997), lassen sich die molaren Mengen an

eingesetzter Patienten-RNA und internem Standard aus den PCR-Produktmengen ableiten. Dabei ist die Produktmenge linear proportional zum Fluoreszenzsignal der entsprechenden Bande im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel. Bei der Auswertung wurde ein Korrekturfaktor berücksichtigt, da es sich bei der internen Kontrolle um ein 60 bp verkürztes Fragment handelt, das aufgrund der Deletion weniger EtBr einlagern kann. Der Korrekturfaktor wurde wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Korr.Faktor} &= \text{bp LBD}_{\text{Ziels.}}/\text{bp } \Delta\text{LBD} \\ &= 347\text{bp}/287\text{bp} \\ &= 1,2 \end{aligned}$$

4.2 Quantitative Bestimmung der hGR-mRNA am Beispiel eines ALL-Patienten

Von den Ansätzen der quantitativen, kompetitiven PCR wurde eine analytische Gelelektrophorese durchgeführt (s. Abb. 3) und die Fluoreszenzsignale der EtBr-gefärbten Banden unter UV-Licht als tif-Datei digitalisiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (WinCam 2.2, Cybertech), das die Intensität der fluoreszierenden Banden ermittelt und als Flächenprozent darstellt. Die Werte sind in Tabelle 1 dokumentiert. Unter Berücksichtigung eines Korrekturfaktors (s. 4.1) wurden die Flächen ins Verhältnis gesetzt und gegen die Menge an internem Standard graphisch aufgetragen (s. Abb. 4). Anhand der sich ergebenden Gerade wurde bei einem Flächenquotienten von 1 die Menge an GR-mRNA abgelesen.

Spur	1	2	3	4	5	6
LBD _{Ziels.} (%)	/	10,11	13,83	21,56	21,54	31,52
$\Delta\text{LBD}(\%)$	83,3	26,62	19,69	13,03	9,31	2,52
$\Delta\text{LBD}_{\text{korr.}}(\%)$	100	31,94	23,63	15,64	11,17	3,08
$\frac{\Delta\text{LBD}_{\text{korr.}}}{\text{LBD}_{\text{Ziels.}}}$	/	3,16	1,71	0,73	0,52	0,098
$\Delta\text{LBD}(\text{fmol})$	0,53	0,53	0,27	0,135	0,07	0,035

$$\text{Korr.Faktor} = 1,2$$

Tab. 1: Auswertung der fluoreszierenden Banden der Spuren 1-6 am Beispiel eines ALL- Patienten

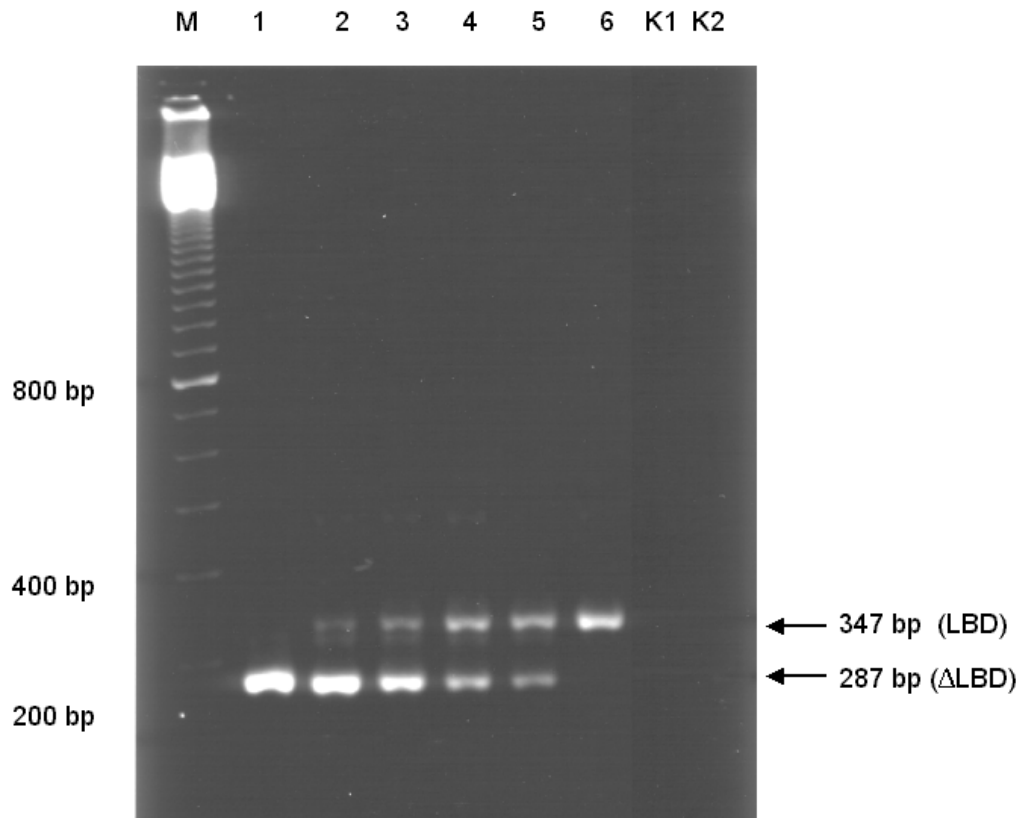


Abb. 3: hGR-mRNA-Bestimmung am Beispiel eines ALL- Patienten mit Hilfe der quantitativen, kompetitiven RT-PCR im EtBr-gefärbten Agarosegel

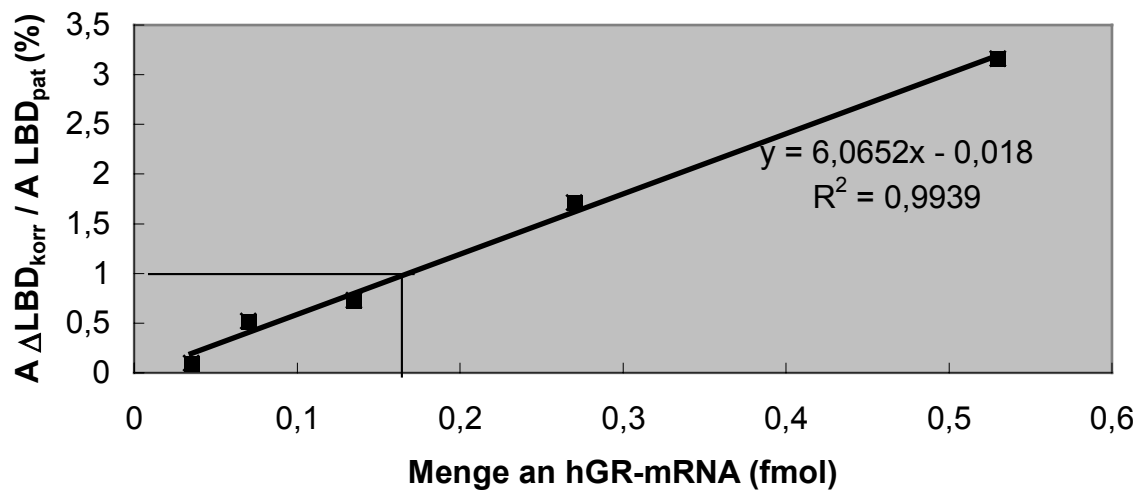


Abb. 4: Quantitativer Fluoreszenz-Plot am Beispiel eines ALL-Patienten

4.3 Bestimmung der hGR-mRNA in Lymphoblasten und Lymphozyten

4.3.1 Quantifizierung der hGR-mRNA in Lymphoblasten des Knochenmarks von ALL-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Ausgehend von 4-8 ml Knochenmark wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen gewonnen (s. Methoden 3.8.4). Die Zellen wurden gezählt (s. Methoden 3.8.5) und deren Gesamt-RNA isoliert (s. Methoden 3.5.1.2). Aus 1×10^7 Zellen konnte durchschnittlich 10 µg Gesamt-RNA isoliert werden. Die gewonnene RNA wurde durch DNase von eventuell genomischen DNA-Kontaminationen befreit. In mehreren Reaktionsansätzen wurden jeweils 250-500ng RNA Probe mit verschiedenen Mengen (1-150pg) an internem Standard versetzt, revers transkribiert und anschließend mit RNaseH behandelt. 1/10 Vol. des cDNA-Ansatzes wurde in die kompetitive PCR eingesetzt. Nachdem die PCR-Produkte in einem analytischen Agarosegel (2,5%) aufgetrennt worden waren, konnten die hGR-mRNA-Konzentrationen in den Patientenproben quantifiziert werden (s. 4.2).

Die Durchschnittskonzentration der hGR-mRNA in Lymphoblasten des Knochenmarks von gesunden Kontrollpersonen betrug $0,030 \text{ fmol}/100\text{ng RNA}_{\text{ges.}} (n=3; \text{Sd}=0,004)$. Knochenmarkproben von weiteren gesunden Kontrollpersonen standen nicht zur Verfügung. Bei ALL-Patienten, die kaum auf eine initiale Glucocorticoidtherapie ansprachen („poor responder“), lag die durchschnittliche Konzentration der hGR-mRNA bei $0,028 \text{ fmol}/100\text{ng RNA}_{\text{ges.}} (n=8; \text{Sd}=0,004)$ während bei ALL-Patienten, die gut auf eine Therapie mit Glucocorticoiden ansprachen („good responder“), die durchschnittliche Konzentration der hGR-mRNA bei $0,014 \text{ fmol}/100\text{ng RNA}_{\text{ges.}} (n=5; \text{Sd}=0,014)$ lag.

4.3.2 Quantifizierung der hGR-mRNA in Lymphozyten des peripheren Blutes von ALL-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Aus 8-16 ml frischem peripheren Vollblut von Kontrollpersonen und ALL-Patienten, denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Glucocorticoide verabreicht wurden, konnten 5×10^6 bis 5×10^7 mononukleäre Zellen gewonnen werden (s. Methode 3.8.4). Die aus den Zellen

isolierte Gesamt-RNA wurde DNase verdaut und mit einer Titrationsreihe von internem Standard in die RT-PCR eingesetzt.

Die über die quantitative, kompetitive RT-PCR ermittelte hGR-mRNA-Durchschnittskonzentration betrug im peripheren Blut von gesunden Kontrollpersonen 0,260 fmol/100ng RNA_{ges} (n=5; Sd=0,063), in dem von ALL-Patienten („poor responder“) 0,035 fmol/100ng RNA_{ges} (n=4; Sd=0,001). In mononukleären Zellen von "good responder" wurde eine hGR-mRNA-Konzentration von 0,064 fmol/100ng RNA_{ges} (n=4; Sd=0,001) ermittelt.

	good responder hGR(fmol/100ng RNA _{ges} .) ±Sd	poor responder hGR(fmol/100ng RNA _{ges} .) ±Sd	Kontrollen hGR(fmol/100ng RNA _{ges} .) ±Sd
MNZ peripheres Blut	0,064 ± 0,019; n=4	0,035 ± 0,001; n=4	0,260 ± 0,063; n=5
MNZ Knochenmark	0,014 ± 0,014; n=5	0,028 ± 0,004; n=8	0,030 ± 0,004; n=3

Tab. 2: Zusammenstellung der hGR-mRNA-Durchschnittskonzentrationen von ALL-Patienten (good-und poor-responder) bestimmt mit quantitativer, kompetitiver RT-PCR

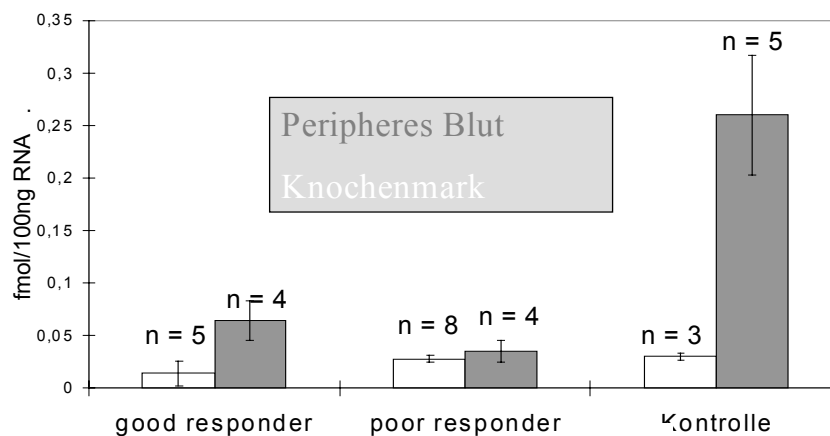


Abb. 5: Quantitative, kompetitive RT-PCR Analyse des hGR-mRNA-Gehalts in mononukleären Zellen (MNZ) im peripheren Blut und Knochenmark von ALL-Patienten und Kontrollen

Der hGR-mRNA-Spiegel in MNZ des peripheren Blutes bei ALL-Patienten („good“- und „poor-responder“) ist im Vergleich zu den MNZ des peripheren Blutes gesunder

Kontrollpersonen um den Faktor 4-8 vermindert. Differenziert man die Patienten in „good“- und „poor responder“, so zeigt sich bei den Patienten, deren Ansprechbarkeit auf GC gering ausfiel („poor responder“) einen um Faktor 2 verminderten hGR-mRNA-Gehalt in MNZ des peripheren Blutes. Im Knochenmark zeigt sich kein signifikanter Unterschied im hGR-mRNA-Spiegel.

4.4 Aufnahmeexperimente von ³H-markiertem Dexamethason in leukämischen Zelllinien

Eine Ursache der Therapieresistenz von GC-resistenten Leukämiezellen könnte eine gestörte Aufnahme von GC sein, d.h. es könnten möglicherweise aktive Transportmechanismen vorliegen, die GC direkt nach deren Aufnahme wieder aus den Zellen schleusen. Ein solcher Export könnte auf einer Überexpression des *mdr1*-Gens oder verwandter membranständiger Transportproteine beruhen. Es soll zunächst die intrazelluläre GC-Konzentration (nach *in vitro* Inkubation mit ³H-Dexamethason) in GC-resistenten und -sensiblen Zelllinien bestimmt werden. Hierzu wurden je 5×10^6 Lymphoblasten einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie 20nM ³H-Dexamethason angeboten, und nach Inkubationszeiten zwischen 35 bis 120 min bei 37°C wurde die Aufnahme des radioaktiv markierten Glucocorticoids in den Zellen im Szintillationsgerät gemessen (s. 3.8.6). Nach 35 min wurde in der „good-responder“-Zelllinie eine Radioaktivität von 14917 ± 864 cpm gemessen, die „poor-responder“-Zelllinie hat im Mittel nur 6594 ± 191 cpm ³H-Dexamethason aufgenommen (s. Tab. 3). Diese Differenz in der Aufnahme von ³H-Dexamethason um den Faktor 2 war bis ca. 90 min gut erkennbar, nach 120 min verringerte sich diese Differenz aufgrund der hohen Standardabweichung bei der „good-responder“-Zelllinie. Die Aufnahmeexperimente zeigten, dass die „poor-responder“-Zelllinie im Vergleich zur „good responder“-Zelllinie das Glucocorticoid verzögert aufnimmt und die Endkonzentration beim „poor-responder“ tendenziell geringer ist (s. Abb. 6). Transportinhibitoren wie Verapamil und Genistein beeinflussten diese Ergebnisse nicht, so dass hauptsächlich die Aufnahme der Glucocorticoide über Diffusion stattfand und es keinen Hinweis auf einen vermehrten aktiven Auswärts-Transportmechanismus gibt (HENNIG et al., 2000).

Zeit (min)	35	MW±Sd	60	MW±Sd	90	MW±Sd	120	MW±Sd
poor responder	6784	6594 ±	10906	8969 ±	11831	10193 ±	10919	10011 ±
poor responder	6403	191	7032	1937	8573	1620	9102	909
good responder	15780	14917 ±	20330	16765 ±	19895	17310 ±	18985	15355 ±
good responder	14053	864	13199	3566	14725	2585	11725	3630

Tab. 3: Zusammenstellung der Ergebnisse der Aufnahme von 20nM ^3H -Dexamethason bei einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie (Doppelansätze)

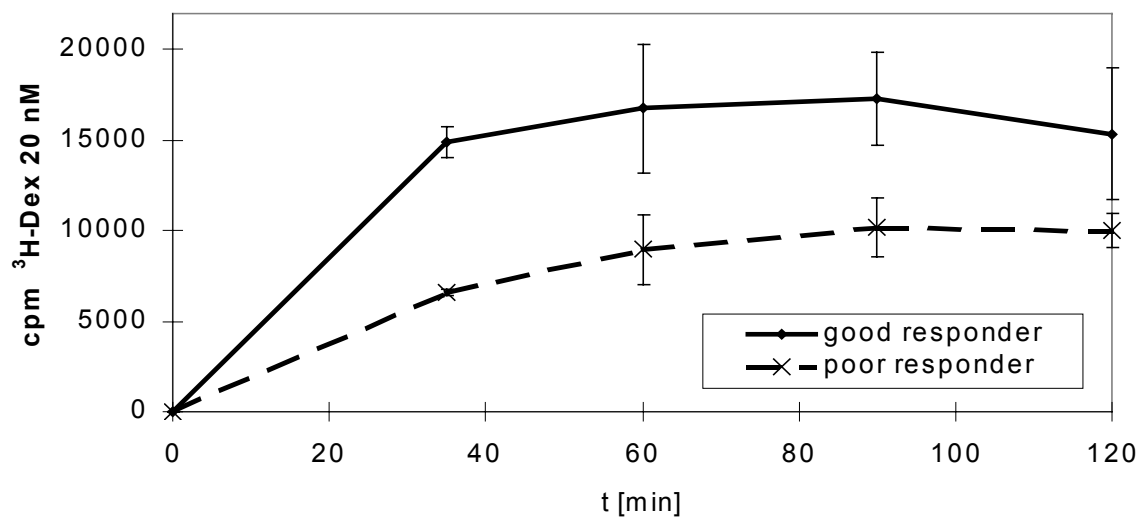


Abb. 6: Internalisierungskinetik von ^3H -Dexamethason (20nM) bei einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie

4.5 Bestimmung des hGR-Proteins in leukämischen Zelllinien

Der hGR liegt in seiner aktiven Form als Homodimer ($\alpha\alpha$) vor. Nach einer 1996 formulierten Hypothese von de CASTRO et al. kann der hGR als Heterodimer aus einer α -Kette und einer β -Kette (alternatives Spleißprodukt der α -Kette) die Bindung des Homodimers an das GRE vermindern, d.h. als dominant negativer Inhibitor wirken (OAKLEY et al., 1999 a). Diese Hypothese soll durch die Bestimmung des hGR α/β -Verhältnisses bei einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie überprüft werden. Die meisten Untersuchungen zum Verhältnis der hGR α/β -Isoformen wurden auf RNA-Ebene durchgeführt (HONDA et al., 2000; TISSING et al., 2001) und führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (OAKLEY et al., 1999a; GAGLIARDO et al., 2000). Untersuchungen auf Proteinebene variieren sehr stark, aufgrund fehlender Spezifität der verwendeten Antikörper. Der einzig kommerziell erhältliche Antikörper der bei Western-Blot-Analysen die β -Isoform des hGR erkennen sollte (Dianova), war unspezifisch und auch nach vielen Optimierungsbemühungen nicht einsetzbar. Es wurden deshalb zwei polyklonale Antikörper eingesetzt, die indirekt den hGR β -Anteil bestimmen haben. Ein Antikörper erkannte den N-Terminus des hGR und somit beide Isoformen α und β . Ein weiterer Antikörper erkannte spezifisch den C-Terminus der α -Isoform und besaß keine Kreuzaktivität zur β -Isoform des hGR. Wertete man die Signalstärken der Autoradiogramme der Western-Blots densitometrisch aus, so zeigte sich, dass die „poor-responder“-Zelllinie im Vergleich zur „good-responder“-Zelllinie einen um 40% reduzierten Anteil an hGR α -Protein besaß (s.Abb.7 unten). Der Anteil an hGR β -Protein müsste demnach in der „poor-responder“-Zelllinie grösser sein als in der „good-responder“-Zelllinie, da kein quantitativer Unterschied in der Expression des Gesamtproteins ($\alpha+\beta$) nachgewiesen wurde (s.Abb.7 oben).

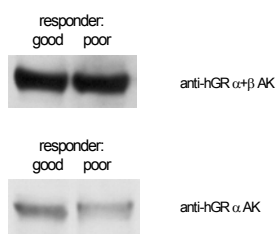


Abb. 7: Westernblot-Analyse bei einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie mit anti-hGR $\alpha+\beta$ -Antikörper und anti-hGR α -Antikörper

4.6 Untersuchungen zur Signaltransduktionskaskade des hGR

4.6.1 Etablierung von transienten Transfektionen und Reporteranalysen bei Zelllinien und Primärzellen von ALL-Patienten

Glucocorticoide wirken, indem sie im Zellkern verschiedenartige genetisch festgelegte Signale auslösen. Es sollte untersucht werden, ob die Signalwirkung des Glucocorticoids auf den Kern der Leukämiezellen von Patienten mit schlechten Ansprechen auf Glucocorticoide („poor-responder“) gestört ist.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde ein System etabliert, mit dem Reporteranalysen bei zwei „good- und poor-responder“-Zelllinien und 16 Kurzzeitkulturen von Leukämieblasten durchgeführt werden konnten. Dazu wurden jeweils 2×10^5 Zellen mit dem Plasmid GRE-SEAP transient transfiziert, welches den auf GC reagierenden Sequenzabschnitt, das sog. GRE, einen Dexamethason-induzierbaren Promotor und als Reporter gen die sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP) enthält (s. Abb. 8.)

Es wurden mehrere kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien getestet und für die Leukämiezelllinien und die Primärzellen optimiert. Die Transfektionseffizienz wurde über die Aktivität der β -Galaktosidase in den Zellen gemessen und erlangte mit dem kationischen Lipid DMRIE-C (Life Technologies) ihr Maximum. Der Prozentsatz transfizierter Zellen betrug bei den leukämischen Zelllinien ca. 30%, bei den Primärzellen nur 5%. Das optimale Verhältnis von Transferreagenz zur Plasmid-DNA betrug 1:1, die optimale Inkubationszeit des Transfektionskomplexes belief sich auf 4 h und das Reporter gen erreichte seine höchste Aktivität nach 60 h.

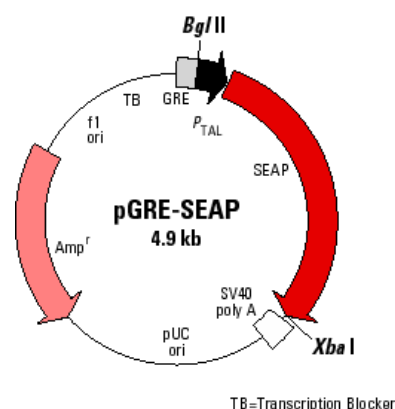


Abb. 8: Plasmid GRE-SEAP, mit dem die Zelllinien und Primärzellen von ALL-Patienten transient transfiziert wurden

4.6.2 Vergleich der Reporterogenaktivitäten zwischen „good“- und „poor-responder“-Patienten

Von jedem Patienten (Primärzellkulturen) bzw. jeder Zelllinie erfolgten Dreifachansätze. Es wurden jeweils 2×10^5 Zellen pro „Well“ (24Well-Platte) in serumreduziertem Medium mit 1,2 µg pGRE-SEAP und 1,2 µl DMRIE-C transient transfiziert (s. Methode 3.8.7). Nach 24 h Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂ Atmosphäre erfolgte die Zugabe von 1×10^{-9} M Dexamethason zur Induktion des Reportergens SEAP. Kontrollansätze ohne Dexamethasonzugabe wurden parallel dazu durchgeführt. Da SEAP ein sekretorisches Reporterogen ist, wurden 60 h nach der Transfektion die Überstände der Zellkulturen gesammelt und jeweils Aliquots im Chemilumineszenz-Assay gemessen. Die Expressionswerte des Reportergens wurden als relative Lichteinheiten (RLU) im Luminometer gemittelt.

Die Reportergen-Aktivität der „poor-responder“-Zelllinie lag mit 2563 ± 320 RLU um den Faktor 8 unter der Reportergen-Aktivität der „good-responder“-Zelllinie (20613 ± 2576 RLU; Abb.9). Kotransfektionen mit einem β-gal-Plasmid (ohne GRE) zeigten annähernd gleiche Expressionswerte (poor-responder=727 RLU; good-responder=806 RLU; Abb.9), so dass von einer gleichen Transfektionseffizienz ausgegangen wurde (HENNIG et al., 2000).

Neben den Zelllinien wurden die Reportergenaktivitäten von 16 Primärzellkulturen von ALL-Patienten mit dem Assay gemessen:

poor-responder	570	600	910	1080	1390	1400	1690	1810
good-responder	1530	1600	2100	2120	3310	3330	5410	5480

Tab. 4: Zusammenstellung der Messwerte von Reportergenaktivitäten (RLU) der Primärzellkulturen (8 „poor-responder“ und 8 „good-responder“ ALL-Patienten)

Die Werte beider Gruppen von Primärzellkulturen wurden mittels deskriptiver Statistik (Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen) genauer untersucht: Bei good- und poor-respondern erfolgte die graphische Darstellung im Box-Whisker-Plot (s. Abb.10). Zur

respondern erfolgte die graphische Darstellung im Box-Whisker-Plot (s. Abb.10). Zur Berechnung des Signifikanzniveaus (p) wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt. Die Expressionen des Reportergens SEAP bei poor-respondern waren im Vergleich zu good-respondern signifikant niedriger (Mediane: poor-responder=1235; (n=8); good-responder=2715; (n=8); p=0,002; s. Abb.10). Das Konfidenzintervall (25-75%) lag für die gemessenen Werte in der „poor-responder“-Gruppe im Bereich von 755-1545 RLU. Demgegenüber lagen die Werte in der Gruppe der „good-responder“ für das entsprechende Konfidenzintervall bei 1850-4370 RLU. Das p-Niveau zeigte mit einem Wert von 0,002 eine hohe Signifikanz.

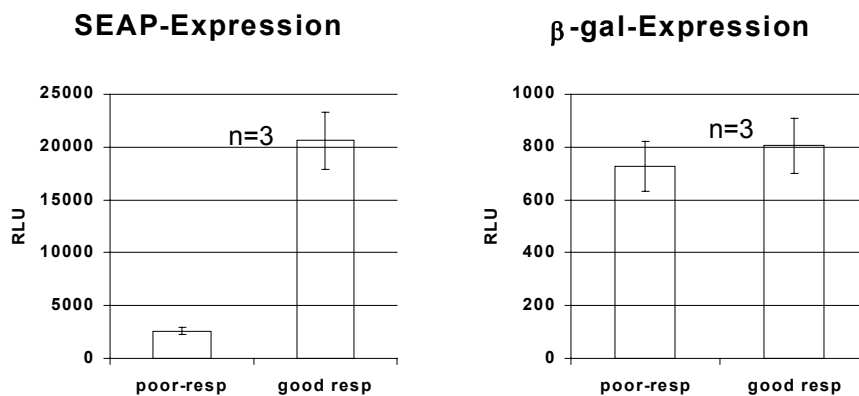


Abb. 9: Aktivitäten von Reportergenen (RLU) bei einer „poor“- und einer „good-responder“-Zelllinie (links: SEAP-Expression; rechts: β-Galaktosidase-Expression)

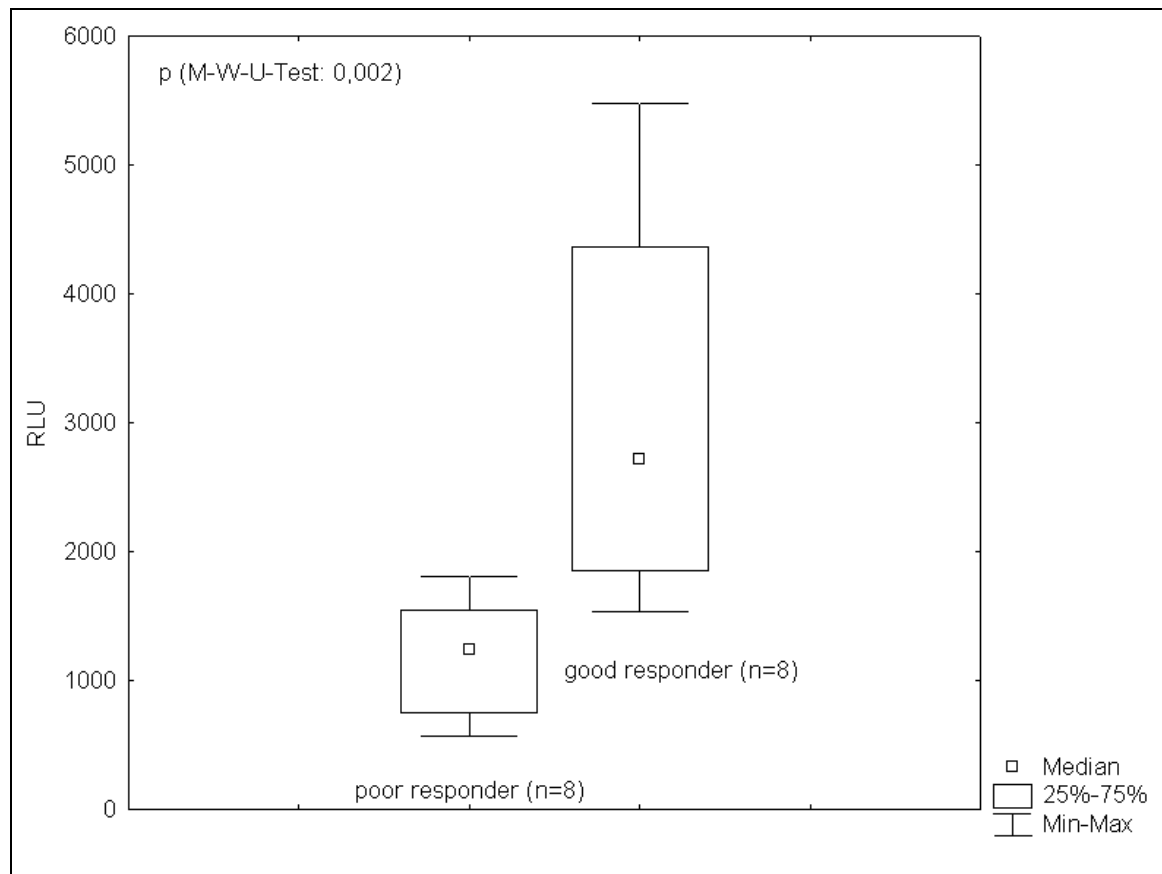


Abb. 10: Aktivitäten des Reportergens SEAP bei Primärzellkulturen von good- und poor-respondern (Box-Whisker-Plot).

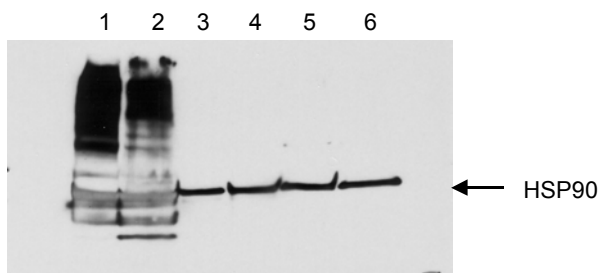
4.7 Untersuchungen zu Proteininteraktionen des hGR im Cytosol

Die bisher gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Reaktionskaskade des humanen Glucocorticoidrezeptors bei „poor-responder“ gestört ist und somit zur Ursache der GC-Resistenz beitragen kann. Voraussetzung für die Aktivierung GC-sensitiver Gene im Zellkern ist die Aktivierung des hGR im Cytosol. Der hGR liegt als Heterokomplex gebunden an HSP90 und Immunophilinen im Cytoplasma vor. HSP90 wirkt als Chaperon und ist notwendig für die Bindung des hGR an das Hormon, nach erfolgreicher Bindung dissoziiert das HSP vom hGR ab. Mutationen und eine veränderte Expression der Chaperone könnten mit reduziertem Ansprechen des hGR auf Glucocorticoide assoziiert sein. Die Zellen einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie wurden mit und ohne Dexamethason (100nM) für 1-3h bei 37°C inkubiert und anschließend mit CHAPS-Puffer, einem schwachen

Detergenz, das den hGR-Heterokomplex erhält, lysiert. Die Fällung des Komplexes erfolgte entweder mit einem Antikörper gegen hGR α oder hGR β oder gegen HSP90. Nach mehreren Waschschritten wurde der Proteinkomplex eluiert und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde „geblottet“ und es erfolgte eine Detektion mit den Antikörpern gegen HSP90, FKBP51 und FKBP52.

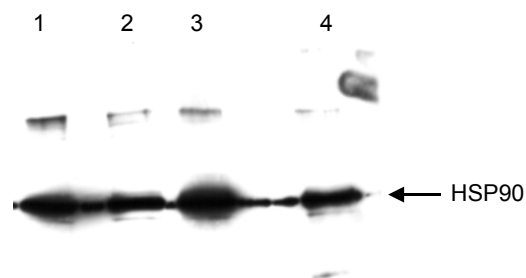
4.7.1 Der hGR im Komplex mit dem Hitzeschockprotein HSP 90

Da HSP90 als Chaperon für die Bindung des hGR an das Glucocorticoid notwendig ist und beim Transport des hGR vom Cytosol in den Zellkern eine wichtige Rolle spielt (DEF FRANCO et al., 2000), wurde seine Expression bei „good“- und „poor-responder“-Zelllinien von ALL-Patienten untersucht. Western-Blot-Analysen mit Gesamtzelllysaten von einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie zeigten eine gleichstarke Expression von HSP90 (s. Abb.11, Spur 1+2). Auch wenn die Zelllysate mit dem monoklonalen Antikörper gegen HSP90 und Protein G-Agarose präzipitiert wurden, konnte eine gleichstarke Expression vom HSP90-Protein in „good“- und „poor-responder“-Zelllinien nachgewiesen werden (s. Abb.11, Spur 3-6). Erfolgten Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen die zwei Isoformen α und β , so zeigte sich im Western-Blot bei beiden Zelllinien mehr HSP90-Protein in Verbindung mit dem hGR α -Immunpräzipitat (s. Abb.12, Spur 1+3) als im Komplex mit hGR β (s. Abb.12, Spur 2+4). Demnach würde die hGR α -Isoform bei den eingesetzten „good“- und „poor-responder“-Zelllinien mehr HSP90 binden als die hGR β -Isoform.



- Spur 1: Gesamtzelllysat „poor-responder“
 Spur 2: Gesamtzelllysat „good-responder“
 Spur 3+5: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit HSP 90 Antikörper
 Spur 4+6: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit HSP 90 Antikörper

Abb. 11: Nachweis von HSP90-Protein in Gesamtzelllysaten und Immunpräzipitaten von „poor“- und „good-responder“-Zelllinien

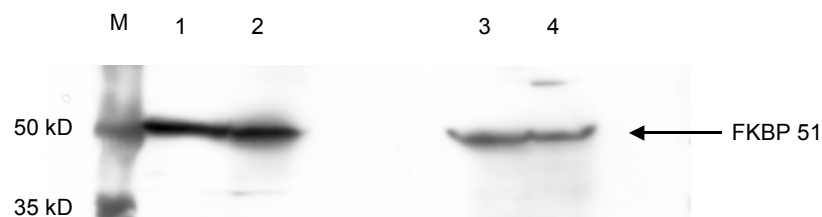


- Spur 1: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit hGR α -Antikörper
 Spur 2: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit hGR β -Antikörper
 Spur 3: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit hGR α -Antikörper
 Spur 4: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit hGR β -Antikörper

Abb. 12: Nachweis von HSP90-Protein im Komplex mit hGR α und hGR β in Immunpräzipitaten einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie

4.7.2 Der hGR im Komplex mit den Immunophilinen FKBP 51 und FKBP52

Neben den Hitzeschockproteinen interagieren sogenannte Immunophiline im Cytosol mit dem hGR-Komplex. Immunophiline sind hochkonservierte cis-transpeptidyl-propyl-Isomerasen, die Immunsuppressiva wie Cyclosporin, FK506 und Rapamycin binden. Immunophilin FKBP51 ist nach DENNY et al. (2000) bei Primaten ein potentieller Inhibitor der GR-Bindung. Seine Expression reduziert die Bindungsaffinität des GR zum Dexamethason. Eine mögliche Überexpression von FKBP51 bei „poor-responder“ könnte eine gestörte Aktivierung des hGR erklären. Ein weiteres Immunophilin, das FKBP52, soll eine Verbindung zwischen dem GR-HSP90-Heterokomplex und cytoplasmatischem Dynein, ein Motorprotein, das für den Kerntransport von GR über Mikrotubuli notwendig ist, vermitteln (GALIGNIANA et al., 2001).

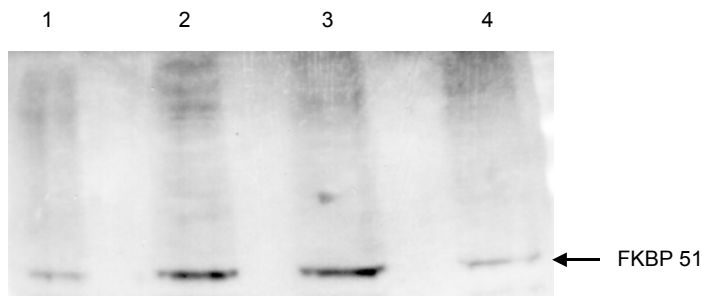


Spur 1+3: Gesamtzelllysate „poor-responder“ Zelllinie
Spur 2+4: Gesamtzelllysate „good-responder“ Zelllinie

Abb. 13: Nachweis von FKBP51-Protein in Gesamtzelllysaten von einer „poor“- und einer „good-responder“-Zelllinie

Der Western-Blot (Abb.13) zeigt, dass das Protein FKBP51 in Gesamtzelllysaten der „poor“- und „good-responder“-Zelllinie gleich stark vorhanden war. Da FKBP51 bei dieser „poor-responder“-Zelllinie nicht verstärkt nachgewiesen wurde, kann hier eine eventuell gestörte Aktivierung des hGR nicht über die Überexpression von FKBP51 erklärt werden.

Nach Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen hGR α in Lysaten von „poor“- und „good-responder“-Zelllinien konnte ein quantitativer Unterschied von FKBP51-Protein im Western-Blot (s. Abb.14) in beiden Zelllinien festgestellt werden. Erfolgte keine Dexamethasoninduktion vor der Zellyse, so wurde im Immunpräzipitat der „poor-responder“-Zelllinie weniger FKBP51-Protein im Komplex mit hGR α vorgefunden (s. Abb.14, Spur 1) als im Präzipitat der „good-responder“-Zelllinie (s. Abb.14, Spur 3). Wurden die Zellen mit Dexamethason vorinkubiert, so verhielt es sich umgekehrt: Im Immunpräzipitat der „poor-responder“-Zelllinie fand sich mehr FKBP51-Protein im Komplex mit hGR α (s. Abb.14, Spur 2) als im Immunpräzipitat der „good-responder“-Zelllinie (s. Abb.14, Spur 4).

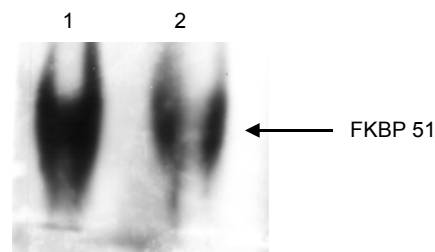


- Spur 1: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit hGR α -Antikörper ohne Dexamethason-Induktion
- Spur 2: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit hGR α -Antikörper mit Dexamethason-Induktion
- Spur 3: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit hGR α -Antikörper ohne Dexamethason-Induktion
- Spur 4: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit hGR α -Antikörper mit Dexamethason-Induktion

Abb. 14: Nachweis von FKBP51-Protein im Komplex mit hGR α in Immunpräzipitaten einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie (mit/ohne Dexamethasoninduktion)

Der Western-Blot von Abb.15 bestätigt das Ergebnis aus Abb.14. Nach einer dreistündigen Induktion mit 100nM Dexamethason wurden jeweils 1×10^7 Zellen einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie mit CHAPS-Puffer lysiert und mit hGR α -Antikörper über Nacht präzipitiert (s. 3.7.5). Nach mehreren Waschschritten wurde das Präzipitat auf einem 8%igen Polyacrylamidgel (denaturierend) der Größe nach aufgetrennt, geblottet und die Membran mit anti-FKBP51-Antikörper hybridisiert. Im Immunpräzipitat mit hGR α der „poor-responder“-

Zelllinie wurde mehr FKBP51-Protein als im Präzipitat der „good-responder“-Zelllinie nachgewiesen. Die alpha-Isoform des hGR scheint das FKBP51-Protein in der „poor-responder“-Zelllinie auch nach Dexamethasongabe noch verstärkt gebunden zu haben. Nach DAVIS et al. (2002) müsste dieses Immunophilin durch den Impuls von Dexamethason vom hGR abdissozieren und der hGR somit aktiviert werden. Hier scheint dieser Aktivierungsweg bei poor-respondern verändert vorzuliegen, da ein hoher Anteil an FKBP51-Protein auch nach einer Dexamethasoninduktion im Immunpräzipitat der „poor-responder“-Zelllinie festgestellt wurde (s. Abb. 14+15).

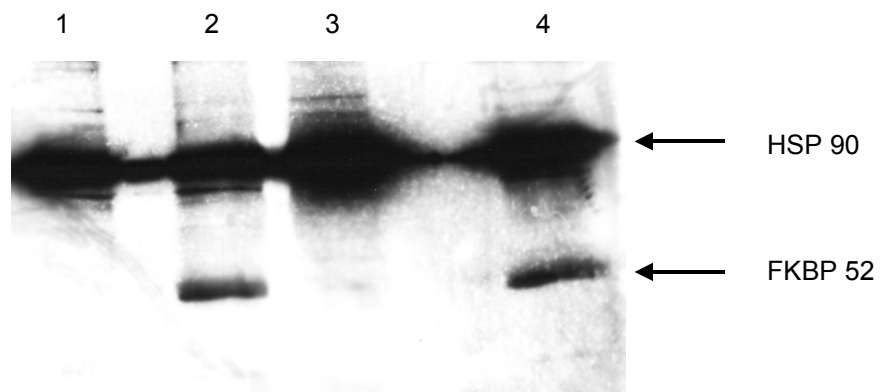


- Spur 1: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit hGR α -Antikörper mit Dexamethason-Induktion
Spur 2: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit hGR α -Antikörper mit Dexamethason-Induktion

Abb. 15: Nachweis von FKBP51-Protein im Komplex mit hGR α in Immunpräzipitaten einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie nach Dexamethasoninduktion

Neben FKBP51 ist das Immunophilin FKBP52, auch HSP56 genannt, bei der Aktivierung des hGR von großer Bedeutung. Nach einer Induktion mit Glucocorticoiden, hier mit Dexamethason, müsste FKBP51 durch FKBP52 ersetzt und anschließend der aktivierte hGR in Verbindung mit cytoplasmatischem Dynein zum Zellkern transportiert werden (DAVIS et al., 2002). Mittels Immunpräzipitationen und sich anschließender Western-Blot-Analyse wurde der Frage nachgegangen, ob möglicherweise im Cytosol der Zelllinien unterschiedliche FKBP52-Proteinmengen mit dem hGR komplexiert vorliegen und somit eine veränderte Translokation von aktivem hGR in den Nucleus und ein mögliches Ausbleiben der Aktivierung GC-sensitiver Gene erklärt werden könnte.

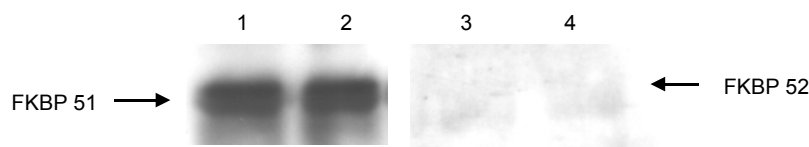
Nach Immunpräzipitationen mit anti-hGR α -Antikörpern konnte weder in Lysaten von der „poor-responder“- noch in solchen der „good-responder“-Zelllinie das FKBP52-Protein nachgewiesen werden (s. Abb.16, Spur 1+3). Wurden die Lysate beider Zelllinien mit anti-hGR β -Antikörpern präzipitiert, so zeigte sich in beiden Zelllinien ein spezifischer Nachweis von FKBP52-Protein (s. Abb.16, Spur 2+4). Der Western-Blot zeigt, dass FKBP52-Protein in Abwesenheit von Dexamethason allein von der beta-Isoform des hGR gebunden vorlag. Die alpha-Isoform lag somit, in Abwesenheit von Dexamethason, sowohl bei der „good“- als auch bei der „poor-responder“-Zelllinie nicht mit FKBP52 komplexiert vor. Weiterhin zeigt der Western-Blot in Abb.16 einen sehr starken Anteil an HSP90-Protein in allen Immunpräzipitaten und in beiden Zelllinien. HSP90 konnte demnach in Abwesenheit von Dexamethason einen Komplex mit der hGR α -Isoform allein und in Verbindung mit der hGR β -Isoform mit FKBP52 bilden.



- Spur 1: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit hGR α -Antikörper ohne Dexamethason-Induktion
Spur 2: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit hGR β -Antikörper ohne Dexamethason-Induktion
Spur 3: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit hGR α -Antikörper ohne Dexamethason-Induktion
Spur 4: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit hGR β -Antikörper ohne Dexamethason-Induktion

Abb. 16: Nachweis von FKBP52 und HSP90-Protein im Komplex mit hGR α und hGR β in Immunpräzipitaten einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie (ohne Dexamethasoninduktion)

Nach Dexamethasoninduktion konnte im Western-Blot in den Immunpräzipitaten mit anti-hGR β -Antikörpern das FKBP51-Protein in der „good“- und „poor-responder“-Zelllinie gleichstark nachgewiesen werden (s. Abb.17, Spur 1+2). FKBP52 konnte auch nach Dexamethasoninduktion nicht im Komplex mit hGR β nachgewiesen werden (s. Abb. 17, Spur 3+4). Erfolgt Immunpräzipitationen mit anti-hGR α -Antikörpern bei „good“- und „poor-responder“-Zelllinien, die zuvor mit Dexamethason induziert wurden, konnte ebenso kein FKBP52-Protein nachgewiesen werden.



- Spur 1: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit hGR β -Antikörper mit Dexamethason-Induktion
 Spur 2: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit hGR β -Antikörper mit Dexamethason-Induktion
 Spur 3: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit hGR β -Antikörper mit Dexamethason-Induktion
 Spur 4: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit hGR β -Antikörper mit Dexamethason-Induktion

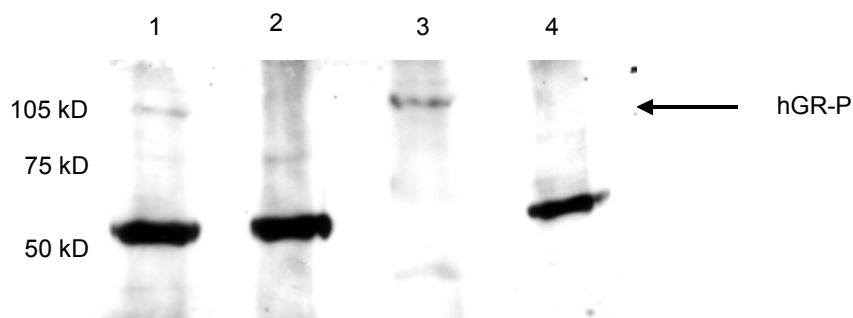
Abb. 17: Nachweis von FKBP51- (Spur1+2) und FKBP52-Protein (Spur3+4) im Komplex mit hGR β in Immunpräzipitaten einer „good“- und „poor-responder“-Zelllinie (mit Dexamethasoninduktion)

4.8 Untersuchungen zur Phosphorylierung des hGR und des Immunophilins FKBP52

Phosphorylierung von Rezeptoren ist ein genereller Regulationsmechanismus in Zellen. Der hGR kann N-terminal an multiplen Serinresten phosphoryliert werden. Dieser Prozess ist hormonabhängig; in Abwesenheit von Steroidhormonen ist der basale Anteil von phosphoryliertem hGR niedrig, nach Dexamethasongabe wird der hGR hyperphosphoryliert (BODWELL et al., 1998). WANG et al. postulierte im Jahr 2002, dass je nachdem welcher Serinrest phosphoryliert wird, der hGR cytoplasmatisch oder nucleär vorliegen kann.

Mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Serin wurden Immunpräzipitationen bei einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie durchgeführt, das Präzipitat in einem 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Hybridisiert wurde die Membran mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen die hGR α -Isoform gerichtet ist. Im Western-Blot konnte eindeutig bei der „good“- und „poor-responder“-Zelllinie, die nicht mit Dexamethason behandelt wurden, eine spezifische Bande,

die der Größe des phosphorylierten hGR α -Proteins entspricht, identifiziert werden (s. Abb.18, Spur 1+3). Wurden beide Zelllinien mit Dexamethason induziert, konnte kein hGR α -Protein mehr detektiert werden (s. Abb.18, Spur 2+4). Zusätzlich in Erscheinung trat ein unbekanntes Protein mit einer Größe von ca. 50-60 kD, das in Spur 1, 2+4 (s. Abb.18) detektiert wurde. Auffallend war, dass dieses phosphorylierte Protein im Immunpräzipitat der „good-responder“-Zelllinie, die nicht mit Dexamethason induziert wurde, nicht vorhanden war.

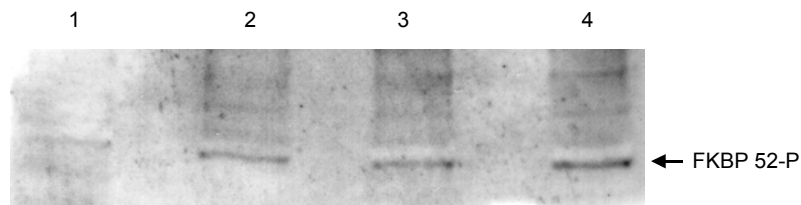


- Spur 1: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit P-Serin-Antikörper, ohne Dexamethasoninduktion
 Spur 2: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit P-Serin-Antikörper, mit Dexamethasoninduktion
 Spur 3: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit P-Serin-Antikörper, ohne Dexamethasoninduktion
 Spur 4: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit P-Serin-Antikörper, mit Dexamethasoninduktion

Abb. 18: Nachweis von hGR α -Protein in Immunpräzipitaten mit phosphorylierten Serin-Antikörpern von „poor“- und „good-responder“-Zelllinien

Mit weiteren Immunpräzipitationen wurde untersucht, ob sich möglicherweise FKBP52 als das unbekannte phosphorylierte Protein (s. Abb.18) herausstellt. Mit anti-FKBP52-Antikörpern wurde das FKBP52-Protein spezifisch in den Zelllysaten der „good“- und „poor-responder“-Zelllinie präzipitiert, im denaturierendem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, ‚geblottet‘ und die Membran mit Antikörpern gegen Phosphoserin hybridisiert. Das phosphorylierte FKBP52-Protein wurde in beiden Zelllinien nachgewiesen (s. Abb.19), auch im Präzipitat der „good-responder“-Zelllinie, die zuvor nicht mit Dexamethason behandelt wurde. Der Phosphorylierungsgrad des FKBP52-Proteins in der „poor-responder“-Zelllinie, die keine Dexamethasoninduktion erhielt (s. Abb. 19, Spur 1), fiel etwas geringer aus als der in der „poor-responder“-Zelllinie, die zuvor mit Dexamethason induziert wurde (s. Abb. 19,

Spur 2). Innerhalb der „good-responder“-Zelllinie (s. Abb.19, Spur 3+4) wurde kein Unterschied im Phosphorylierungsstatus der Serinreste des FKBP52-Proteins ersichtlich.



- Spur 1: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit FKBP52-Antikörper ohne Dexamethason-Induktion
- Spur 2: Immunpräzipitat einer „poor-responder“ Zelllinie mit FKBP52-Antikörper mit Dexamethason-Induktion
- Spur 3: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit FKBP52-Antikörper ohne Dexamethason-Induktion
- Spur 4: Immunpräzipitat einer „good-responder“ Zelllinie mit FKBP52-Antikörper mit Dexamethason-Induktion

Abb. 19: Nachweis des phosphorylierten FKBP52-Proteins in Immunpräzipitaten mit phosphorylierten Serin-Antikörpern von „good“- und „poor-responder“-Zelllinien

5. Diskussion

5.1 Der Glucocorticoidrezeptor bei Leukämien

Während bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) kein signifikanter Unterschied in dem GR-Level zwischen „responder“ und „non-responder“ entdeckt wurde (WEISS et al., 1990), beschrieb KATO et al. 1993 eine positive Korrelation zwischen hohem GR-Gehalt in Blasten von ALL-Patienten und erfolgreichem Therapieansprechen. ALL-Patienten mit mehr als 8000 GR/Zellen, so postulierte KATO et al. 1993, besitzen eine bessere Prognose und höhere Remissionsraten nach initialer Glucocorticoidtherapie als Kinder mit geringeren GR-Werten. GR-Messungen erfolgten meistens an Lymphoblasten des Knochenmarks. Die Verfahren beruhten vor allem auf Radioligandenbindung: intakten Zellen wurde [³H]Dexamethason angeboten, welches von den Zellen aufgenommen wurde und im Cytosol an den GR band, der wiederum durch die anschließende Translokation in den Zellkern gelangte. Weitere Untersuchungen an den Kernfraktionen und an intakten Zellen ergaben große Standardabweichungen in der ermittelten durchschnittlichen Glucocorticoidrezeptorzahl.

In bisher durchgeführten Versuchen der Ligandenbindungsmethode wurde immer die letzte Stufe der Genexpression, das Rezeptorprotein, nachgewiesen. Frühere Stufen, wie die dafür kodierende mRNA, die ein relatives Maß für die GR-Expression darstellt, wurden nicht untersucht. Eine Quantifizierung anhand der GR-mRNA -wie in der vorliegenden Arbeit - hat den Vorteil gegenüber Radiorezeptortests, dass endogene Liganden die Messung nicht beeinflussen können, die Sensitivität und Spezifität sehr hoch ist und dass auf radioaktive Nuklide verzichtet werden kann. Mit einer etablierten RT-PCR besitzt man eine sensitive Methode, um Veränderungen in der Genexpression, z.B. transkriptionelle Aktivität, Stabilität der RNA und größere Strukturveränderungen (Deletionen, Insertionen, aberrantes Splicen) feststellen zu können.

5.2 Der hGR in Lymphozyten

Die hGR-Dichte in einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen, wie B- und T-Zellen, Helfer-, Suppressor- und Killerzellen zeigt keine signifikanten Unterschiede, so dass die unterschiedliche Wirkung auf diese Zellen mit spezifischen glucocorticoidsensitiven Genmustern in den verschiedenen Lymphozytenpopulationen sowie unterschiedliches Ansprechen auf glucocorticoidinduzierte Zytokine erklärt wird (LIPPMAN & BARR, 1977). Die hGR-vermittelten Glucocorticoidwirkungen sind Gegenstand intensiver Forschung.

Nach einer Verabreichung von Glucocorticoiden tritt beim Menschen eine Leukozytose mit absoluter Lymphozytopenie auf, welche alle Subklassen von Lymphozyten betrifft, am stärksten aber T-Zellen und unter ihnen hauptsächlich CD4⁺ Zellen. Diese Dezimierung der Lymphozytenzahl im Blut ist u.a. als Folge einer allgemeinen Umverteilung der Abwehrzellen im Körper zu verstehen und kommt nicht allein durch Zelltod zustande (BLOEMENA et al., 1990). Glucocorticoide wirken auch auf Endothelien von Gefäßen in lymphatischen Organen. Vor allem im Knochenmark werden Lymphozyten wahrscheinlich auf diese Weise mechanisch zurückgehalten. Als Folge der verminderten Freisetzung findet sich im Blut und in den Lymphknoten eine herabgesetzte Lymphozytenkonzentration. Durch die Bindung von Liganden an den hGR wird das Proliferationsverhalten humaner Lymphozyten auf komplexe Weise beeinflusst. Postuliert wird sowohl eine Steigerung (STRAUS, 1988) als auch eine Hemmung (SMITH et al., 1977) des Zellwachstums, je nachdem welche Untersuchungsbedingungen herrschen und welche Subklasse von Zellen untersucht wird.

Die Aktivität der verschiedenen Lymphozytenpopulationen wird je nach Zelltyp und Versuchsbedingungen unterschiedlich moduliert. Die Killerzellaktivität wird in der Regel durch Glucocorticoide vermindert (SCHLEIMER et al., 1984), wie auch die Synthese und Sekretion von Immunglobulinen und Interferon γ . Ebenso wird die Synthese von Interleukin-1 (IL1) und Interleukin-6 (IL-6) in Monozyten und Makrophagen durch Glucocorticoide supprimiert (ZANKER et al., 1990). Die Wirkung von Interleukin-2 (IL-2) beeinflussen Glucocorticoide auf verschiedenen Ebenen. Zum einen wird die IL-2-Synthese in Lymphozyten gehemmt (VACCA et al., 1990), zum anderen die Zahl der IL-2-Rezeptoren durch Hemmung der Neubildung vermindert. Damit fällt ein entscheidender Stimulus für T-Lymphozyten weg, was einen Teil der suppressiven Glucocorticoidwirkung erklärt.

Interessanterweise verstärken Corticoide jedoch die Wirkung einiger Interleukine auf B-Lymphozyten (GALANAUD & EMILIE, 1990).

Die Regulation von Zellwachstum und -aktivität der Lymphozytenpopulationen erfolgt also indirekt über Glucocorticoide, indem sie nach Bindung an den hGR die Synthese von Mediatoren, wie Interleukine, T-Zell-Wachstumsfaktor und Lipocortin beeinflusst.

5.3 Charakterisierung des hGR auf RNA-Ebene

5.3.1 Quantitative Messung von Expressionsprodukten

Die Expression eines Gens kann von der DNA zum Protein auf verschiedenen Ebenen reguliert werden: transkriptionell, posttranskriptionell, translational und posttranslational. Die Regulation der Expression des GR erfolgt primär auf transkriptioneller, desweiteren auf posttranskriptioneller Ebene. So gibt es Hinweise, dass der GR die mRNA-Levels spezifischer Gene beeinflusst, indem er entweder die Stabilität der mRNA verändert (CHOMCZYNSKI et al., 1986; PAEK & AXEL, 1987) oder den Transport von spezifischen mRNAs vom Kern ins Cytoplasma stimuliert (FULTON & BIRNIE, 1985).

Die Detektion von spezifischen RNA-Transkripten ist eine gängige Methode, um Genexpression direkt zu messen. Konventionelle Methoden der RNA-Analyse wie Northern-Blot-Hybridisierung mit anschließender densitometrischer Auswertung benötigen ca. 10-40 µg Gesamt-RNA. Häufig ist aber das Probenmaterial, Knochenmark und Blut von Kindern beschränkt, dass große Mengen an RNA nicht isoliert werden können. Alternative Techniken wie die in-situ-Hybridisierung oder Immunozytochemie sind zwar sensitive Methoden und können auch bei minimalen Probenmengen angewendet werden, es ist jedoch nicht möglich, mit diesen Verfahren quantitative Aussagen zu treffen.

Die quantitative Bestimmung des hGR auf mRNA- und Proteinebene ist für eine Routine-Applikation zu aufwendig (Patientenmaterial häufig limitierend) und daher im klinischen Alltag nicht durchführbar. Daher sollte man eine Methode wählen, die eine hohe Sensivität bei geringem Probematerial und reproduzierbare Quantifizierung liefert. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine solche Methode, die mit einem vorgeschalteten reversen

Transkriptionsschritt (RT) nicht nur zur Erfassung von DNA (PCR), sondern auch zur Erfassung von RNA (RT-PCR) beiträgt.

5.3.2 Anwendung der kompetitiven RT-PCR

Die quantitative Messung der hGR-Expression auf mRNA-Ebene kann über Northern-Blot-Verfahren oder kompetitiver RT-PCR erfolgen. Die konventionelle Methode wie der Northern-Blot ist im Vergleich zur PCR-Technik insensitiv und es werden große Mengen an mRNA zum Nachweis benötigt (MIOSSEC, 1992). Das Bestreben eine quantitative und sensitive hGR-mRNA-Bestimmung mit geringem Probenmaterial durchzuführen, gab den Ausschlag, eine kompetitive RT-PCR, deren Methodik in einer Diplomarbeit etabliert wurde (HENNIG, 1997) anzuwenden. Verschiedene Arbeiten zur kompetitiven RT-PCR existieren (WANG et al., 1989; GILLILAND et al., 1990; BABU et al., 1993). Die von allen Autoren beschriebenen wichtigsten Parameter für eine verlässliche Quantifikation sind:

1. Der Einsatz eines endogenen oder exogenen zugegebenen internen DNA- oder RNA-Standards zur Erfassung von „Reaktionsgefäß-Effekten“.
2. Gleiche Primerbindungsstellen für Standard und Zielsequenz, da die Primerbindungseffizienz den größten Einfluss auf die Amplifikationseffizienz darstellt.
3. Maximale Ähnlichkeit zwischen Standard und Zielsequenz in Bezug auf Länge und GC-Gehalt.
4. Vermeidung einer unterschiedlichen reversen Transkriptionseffizienz.

Die RT-PCR hat den Vorteil, dass trotz eines hohen Hintergrundes an Fremdmolekülen, eine bestimmte Zielsequenz mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert, mit einem gängigen Auswertesystem detektiert und quantifiziert werden kann. Um das hGR-mRNA-spezifische RT-PCR-Protokoll für quantitative Fragestellungen nutzen zu können, war es notwendig, einen geeigneten internen Standard zu entwickeln, der über eine Koamplifikation -ausgehend von einer bekannten Menge an Startmolekülen- die Abschätzung der in der Probe vorhandenen Kopien an hGR-mRNA erlaubt.

5.3.3 Der interne Standard in einer quantitativen PCR

Mit der *in vitro* Vervielfältigung von Nukleinsäuren mittels PCR ist man in der Lage, aus einer minimalen Menge an Startmatrize eine ausreichende Menge von Zielmolekülen zu erzeugen, die nachfolgend analysiert werden können. Um jedoch die Ausgangsmenge an Matrize bestimmen zu können, muss extrapoliert werden. Dies kann entweder ohne Kontrollen oder mit internen bzw. externen Standards erreicht werden. Ohne Kontrollen wird die anfängliche Kopienzahl abgeschätzt, indem man die erhaltene PCR-Produktmenge gegen die Zyklenzahl aufträgt und gegen die Zykluszahl Null extrapoliert (CHELLY et al., 1988). Eine solche Extrapolierung trägt der Tatsache keine Rechnung, dass es Variablen innerhalb der Reaktionsgefäße gibt (Pipettierfehler, Blockpositionsunterschiede etc.), die nicht mit erfasst werden.

Externe Kontrollen werden mit einer bekannten Menge an Startkopien in separaten Reaktionsansätzen durchgeführt und anhand der Ergebnisse werden dann Standardkurven erstellt, die einen PCR-Ertrag einer bestimmten Startkopienzahl gegenüberstellen. Dieser Ansatz erlaubt zwar eine bessere Abschätzung als das Verfahren ohne Kontrolle, jedoch ist hier immer noch keine vollständige Kontrolle des betrachteten PCR-Ansatzes im Hinblick auf die Zielsequenz gegeben: man kann falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse nicht definieren und die Präzision der Methode ist stark reduziert. Methoden, die keinen oder einen externen Standard verwenden, sind äußerst anfällig gegen Variationen in der Replikationseffizienz. Derartige Variationen konnten sogar unter offensichtlich identischen Bedingungen unter Einsatz eines Mastermixes beobachtet werden (GILLILAND et al., 1990; KELLOG et al., 1990). Quantitative PCR sollte demnach immer eine Amplifikation in Gegenwart eines internen Standards sein, einer Kontrolle, die im gleichen Reaktionsgefäß koamplifiziert wird. Es gibt jedoch auch bei diesem Ansatz qualitativ unterschiedliche Möglichkeiten. Bei einer internen Kontrolle, die in unbekannter Startkopienzahl vorliegt, wie z.B. ein ubiquitäres Gen wie β -Aktin, ist zwar die Kontrolle der Reaktion gegeben, aber die Abschätzung der Kopienzahl wird dadurch nicht erleichtert.

Interne Standards, die in definierter Kopienzahl vorliegen, sind also Kontrollen der Wahl. In der Regel sind die Fragmente in einem Plasmid kloniert und stehen als DNA bzw. RNA zur Verfügung. Diese internen Standards sollten mit gleicher Effizienz repliziert werden wie die Matrize, aber gleichzeitig leicht unterscheidbar sein. Die verschiedenen Klassen interner, kompetitiver Standards (BECKER-ANDRE & HALBROCK, 1989; GILLILAND et al.,

1990) unterscheiden sich von der Zielsequenz in der Größe oder in dem Fehlen bzw. Vorhandensein einer Restriktionsschnittstelle (DEVLIN et al., 1992; PIATAK et al., 1993). Standards in dieser Form wurden entweder synthetisch hergestellt und haben außer dem Primerpaar nichts mit der Zielsequenz gemein (WANG et al., 1989), sind also heterologe Standards, oder sie unterscheiden sich von der Zielsequenz nur minimal in ihrer Länge (Insertion, Deletion) und sind damit homologe Standards. Bei der Verwendung eines internen Standards ist es möglich, absolute Mengen der Zielsequenz zu bestimmen, indem man bekannten Mengen an Kompetitor-DNAs bzw. RNAs erlaubt, mit dem Analyten um das Primerpaar zu kompetieren (SIEBERT & LARRICK, 1992).

5.3.4 Quantifizierung der hGR-mRNA in Lymphozyten und Lymphoblasten

Da das Vorhandensein eines funktionellen Rezeptors eine Voraussetzung für die Glucocorticoidwirkung ist, kann die quantitative Bestimmung von Rezeptorspiegeln möglicherweise ein Indikator für das Ansprechen auf die Therapie mit Glucocorticoiden bei Leukämien und malignen Lymphomen sein. Mithilfe der in einer Diplomarbeit (HENNIG, 1997) etablierten kompetitiven RT-PCR wurde die hGR-mRNA in Lymphozyten und Lymphoblasten von ALL-Patienten („good“- und „poor responder“) quantifiziert.

Die Durchschnittskonzentration des hGR-mRNA in Lymphozyten des peripheren Blutes von gesunden Kontrollpersonen betrug 0,26 fmol/100ng RNA_{ges.} (s. Tab. 2), der hGR-mRNA-Gehalt in Lymphozyten von Patienten, die kaum auf Glucocorticoide ansprechen („poor responder“) lag bei 0,035 fmol/100ng RNA_{ges.} (s. Tab. 2) und ist im Vergleich zu den Kontrollen um 86,5% reduziert. Die Ergebnisse zur Bestimmung des hGR-mRNA-Gehalts in Lymphozyten des peripheren Blutes mittels RT-PCR zeigen einen deutlichen Unterschied in der ermittelten hGR-mRNA-Durchschnittskonzentration zwischen „poor responder“ und gesunden Kontrollpersonen um den Faktor 8,7. Beim direkten Vergleich zwischen „good- und poor responder“ ist der hGR-mRNA-Gehalt in MNZ des peripheren Blutes bei „poor-responder“ um den Faktor 2 vermindert. Somit liegt eine Korrelation zwischen dem Ansprechen von ALL-Patienten auf Glucocorticoide und dem Rezeptorstatus in den Lymphozyten vor. Um diese Tendenz statistisch abzusichern, müsste jedoch eine größere Anzahl von Proben untersucht werden.

WEISS et al. (1990) fand auf Proteinebene keinen signifikanten Unterschied im hGR-Level zwischen „responder“ und „non responder“ in Lymphozyten des Blutes und dem positiven Ansprechen auf die Glucocorticoidtherapie. Ein direkter Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen von WEISS ist jedoch nicht möglich, da er Zellmaterial von CLL-Patienten und nicht von ALL-Patienten verwendete. Während die Form der ALL vorwiegend bei Kindern zwischen dem 2. und 6. Lebensjahr auftritt (MAHONEY, 1994), ist die Hauptinzidenz der CLL vorwiegend bei Erwachsenen über dem 50. Lebensjahr (CHAMPLIN, 1991).

Die Quantifizierung der hGR-mRNA in Lymphoblasten des Knochenmarks von gesunden Kontrollpersonen und „poor responder“ mittels RT-PCR zeigte keinen signifikanten Unterschied („poor responder“: 0,028 fmol/100ngRNA_{ges.} (Tab.2)); gesunde Kontrollpersonen: 0,030 fmol/100ngRNA_{ges.} (Tab.2)). Bei Patienten, die gut auf die Glucocorticoidtherapie ansprachen („good responder“), betrug der hGR-mRNA-Spiegel nur 0,014 fmol/100ngRNA (Tab.2) und war im Vergleich zu den „poor responder“ um die Hälfte reduziert. Da keine signifikanten Unterschiede in Lymphoblasten des Knochenmarks zwischen „good- und poor responder“ zu verzeichnen war, scheint der hGR-mRNA-Spiegel in Lymphoblasten des Knochenmarks nicht für eine Prognose der Therapieansprechbarkeit geeignet zu sein. Insgesamt müssten jedoch größere Fallzahlen untersucht werden, damit die Standardabweichung des Mittelwertes geringer ausfällt und ein möglicherweise vorliegender Unterschied in den hGR-mRNA-Konzentrationen zwischen den verschiedenen Patienten-Kollektiven schärfer hervortritt.

Zusammengefasst ergeben die Ergebnisse der quantitativen, kompetitiven RT-PCR keinen Anhalt dafür, dass dem hGR-mRNA-Spiegel im Knochenmark ein prognostischer Wert zugesprochen werden kann. Die Untersuchungen an Lymphozyten des Blutes zeigten, dass die „poor responder“ im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen einen um 87% reduzierten hGR-mRNA-Gehalt aufwiesen. Im Vergleich mit „good responder“ besitzen „poor responder“ ein um 45% reduzierten hGR-mRNA-Gehalt. Unter Berücksichtigung kleiner Patientenkollektive wird eine Korrelation zwischen dem hGR-mRNA-Spiegel in den Lymphozyten und dem Therapieerfolg bei ALL-Patienten mit Glucocorticoiden sichtbar. Ob hierdurch dem hGR-mRNA Spiegel der Lymphozyten einen prognostischer Wert zugesprochen werden kann, muss über entsprechende Studien mit größeren Patientenkollektiven untersucht werden.

5.4 „Multidrug“-Resistenz und Aufnahme von GC in Leukämiezellen

Eine Ursache der Therapieresistenz von GC-resistenten Leukämiezellen könnte eine gestörte Aufnahme von GC sein, d.h. es liegen möglicherweise aktive Transportmechanismen vor, die GC direkt nach deren Aufnahme wieder aus den Zellen schleusen, wie z.B. das P-Glycoprotein. Ein solcher Export könnte auf einer Überexpression des *mdr-1*-Gens oder verwandter membranständiger Transportproteine beruhen. In einer murinen Thymom-Zelllinie, die eine hohe Resistenz gegen Dexamethason zeigte, wurde eine gesteigerte Expression des *mdr-1*-Gens nachgewiesen. Nach Zugabe von Verapamil, ein Hemmstoff des P-Glycoproteins, konnte man wieder einen erhöhten intrazellulären Gehalt an Dexamethason messen (BOURGEOIS et al., 1993; UEDA et al., 1996). In einer *in vitro* Studie mit leukämischen Zellen von 112 kindlichen ALL-Patienten wurde hingegen keine Korrelation zwischen GC-Resistenz und dem Expressionsverhalten des P-Glycoproteins beschrieben (DEN BOER et al., 1998). Eine *in vivo*- Studie mit 90 ALL-Patienten konnte ebenso keine Verbindung zwischen der funktionellen Aktivität des P-Glycoproteins und dem Ansprechen auf Prednison aufzeigen (WUCHTER et al., 2000). Auch weitere assoziierte „Multidrug“-Resistenz-Proteine, wie MRP-1 („multi-drug resistance-related protein“), MVP („major vault protein“), LRP („lung resistance protein“) wurden nicht in leukämischen Zellen von GC-resistenten ALL-Patienten verstärkt exprimiert (DEN BOER et al., 1998).

Mit einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie von kindlichen ALL-Patienten wurde die Aufnahme von ³H-markiertem Dexamethason in einem Zeitraum von 35 bis 120 min untersucht (s. Methode 3.8.6.). Die Ergebnisse (s. 4.5., Tab. 3 + Abb. 6) zeigen, dass die „poor-responder“-Zelllinie im Vergleich zur „good-responder“-Zelllinie das GC langsamer aufnahm und die Endkonzentration beim „poor-responder“ tendenziell geringer war. Da bei der „poor-responder“-Zelllinie bei weiteren Untersuchungen eine geringere Expression von hGR α als bei der „good-responder“-Zelllinie festgestellt wurde (s. 4.5., Abb. 7), könnte dieser quantitative Unterschied die geringere GC-Aufnahme der „poor-responder“-Zelllinie erklären. Wenn der Anteil an hGR α -Protein gering ist, kann auch nur wenig an ³H-Dexamethason gebunden werden. Hemmversuche mit Verapamil und Genistein zeigten keine Auswirkungen auf den intrazellulären ³H-Dexamethason-Gehalt, so dass ein Efflux über P-Glycoproteine bei den verwendeten Zelllinien auszuschließen ist.

5.5 Charakterisierung des hGR auf Protein-Ebene

KATO et al. untersuchte 1993 den hGR-Gehalt auf Proteinebene in Lymphoblasten des Knochenmarks und hat einen direkten Zusammenhang zwischen der hGR-Zahl/Lymphoblast und erfolgreichem Therapieansprechen postuliert. ALL-Patienten mit hohem hGR-Spiegel (9900 Bindungsstellen/Zelle) erreichten erfolgreich eine Remission nach Glucocorticoidgabe, während Patienten mit niedrigem hGR-Spiegel (4800 Bindungsstellen/Zelle) kaum auf die Therapie ansprachen und schlechtere Prognosen auf Heilung besaßen. Obwohl viele der durchgeführten Studien (HO et al., 1982; BLOOMFIELD et al., 1984; IACOBELLI et al., 1984) kein einheitliches Bild aufzeigen, vermutet man eine Korrelation zwischen dem Ansprechen von ALL-Patienten auf Glucocorticoidtherapie und dem Rezeptorstatus. Es wird angenommen, dass bei Rezeptorspiegeln unter einem gewissen kritischen Niveau nicht mit einem Ansprechen auf Glucocorticoide gerechnet werden kann, und man deshalb den betreffenden Patienten die vielfältigen Nebenwirkungen hoher Glucocorticoiddosen ersparen sollte. Weiterhin existieren viele Studien zur Bindungsaffinität des hGR, bei denen aber keine signifikante Korrelation zum Ansprechen auf GC postuliert wurde (HOMO et al., 1980; PUI und COSTLOW, 1986). In mehreren murinen sensitiven und resistenten Zelllinien wurde eine unterschiedliche Bindungsaffinität aufgrund von Temperaturunterschieden entdeckt (VAN DEN BERG et al., 1993). Auch in leukämischen Zellen lagen potentielle Bindungsstellen bei Raumtemperatur maskiert vor, in Lymphoblasten von Patienten mit T-ALL und AML besaßen die hGRs auch bei 37°C eine reduzierte Bindungsaffinität (HAARMAN et al., 2002). Neben geringeren Bindungsaffinitäten zum GC wird eine Überexpression der hGR β -Isoform als mögliche Ursache der GC-Resistenz diskutiert. In respiratorischen Zellen und mononukleären Zellen des peripherem Blutes von GC-resistenten Asthmatikern wurde eine höhere hGR β -Expression nachgewiesen als in Zellen von Asthmatikern, die sensitiv auf GC ansprechen (HAMID et al., 1999). LONGUI et al. (2000) untersuchte Lymphoblasten von 13 T-ALL-Patienten und hatte in den Zellen eine geringere hGR α -Expression im Vergleich zu hGR β nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde auch das Verhältnis von hGR α und β zueinander in Zelllinien untersucht. Western-Blot-Analysen zeigten eine geringere Expression von hGR α gegenüber hGR β in einer „poor-responder“-Zelllinie im Vergleich zu einer „good-responder“-Zelllinie (s. 4.5., Abb. 7). Der höhere Level an hGR β könnte dazu führen, dass im Cytosol vermehrt hGR β über eine Heterodimerisierung hGR α inhibiert und somit weniger hGR α -Homodimere im Nukleus die GRE binden könnten. Dieser Vorgang wäre eine mögliche Ursache für eine GC-Resistenz bei ALL-Patienten.

5.6 Signaltransduktion und Reporter-gen-Analyse des hGR

Untersuchungen zur Kerntranslokation des hGR in Lymphoblasten von ALL-Patienten wurden von COSTLOW & PUI im Jahr 1987 durchgeführt. Es konnte keine Verbindung zwischen dem Ausmaß der Translokation des aktivierten hGR in den Nucleus und dem Ansprechen der ALL-Patienten auf GC hergestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode etabliert, mit der Unterschiede bei der Aktivierung des hGR bei good- und poor-respondern direkt über die Aktivierung eines Reporter-gens gemessen werden können. Hierzu wurden Zelllinien und Primärzellen von ALL-Patienten mit einem Plasmid transient transfiziert, welches das GRE, einen Dexamethason-induzierbaren Promotor und als Reporter-gen die sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP) enthält (s. 4.6.1., Abb. 8). Es konnte gezeigt werden, dass die „poor-responder“-Zelllinie das Reporter-gen SEAP um den Faktor 8 geringer exprimiert als die „good-responder“-Zelllinie (s. 4.6.2., Abb. 9). Reporter-gen-Analysen mit transfizierten Primärzellkulturen von 16 ALL-Patienten zeigten bei poor-respondern eine signifikant geringere Expression des Reporter-gens SEAP im Vergleich zu den good respondern (s. 4.6.2., Abb. 10). Im Box-Whisker-Plot aus Abb.10 wird ersichtlich, dass die Reporter-genaktivitäten von good-respondern eine größere Streubreite besitzen als die von poor-respondern. Innerhalb des Patientenkollektivs „good-responder“ gibt es demnach Patienten, deren Ansprechbarkeit auf GC weniger gut ausfällt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse erstmalig eine Verbindung zwischen einer veränderten hGR-Reaktionskaskade und dem Ansprechen auf GC von „good“-und „poor-responder“-ALL-Patienten.

5.7 Proteininteraktion des hGR im Cytoplasma

Der inaktive hGR befindet sich im Cytoplasma, wo er als Heterokomplex mit den Hitzeschockproteinen HSP90 und HSP70, den Cochaperonen HSP40, Hop (P60) und p23 und den Immunophilinen FKBP52 und CyP40 vorliegt. Dieser Heterokomplex ist für die optimale Konfiguration des hGR notwendig, um die Bindung von GC an den Rezeptor zu ermöglichen (PRATT, 1993). Eine neuere Studie zeigt, dass HSP90 und HSP70 zusammen für die GC-Bindung verantwortlich sind (RAJAPANDI et al., 2000). Weiterhin führen die Hitzeschockproteine im Heterokomplex zu einer Konformationsänderung des hGR, das den Transport des hGR in den Zellkern ermöglicht (DEFRANCO, 2000). KOJIKI et al.

postulierte 1996 einen Zusammenhang zwischen dem Expressionsverhalten von HSP90 und HSP70 und der Sensitivität gegenüber GC in zwei humanen leukämischen Zelllinien.

Das Cochaperon BAG-1 (auch als RAP46 bekannt) kann ebenso mit Kernrezeptoren interagieren. BAG-1 kann HSP70 binden und so die hGR-Heterokomplexformation inhibieren und sich auf die GC-Bindung des hGR auswirken (KANELAKIS et al., 1999; KULLMANN et al., 1998). Die ersten acht Aminosäuren des N-Terminus von BAG-1 wurden für eine DNA-Bindung und die Inhibierung des hGR verantwortlich gemacht (SCHMIDT et al., 2002). KULLMANN et al. zeigte zudem, dass eine Überexpression von BAG-1 zu einer Resistenz gegenüber GC-induzierte Apoptose führen kann.

Mit Hilfe von Immunpräzipitationen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion des hGR im Cytosol mit dem Hitzeschockprotein HSP90 und den Immunophilinen FKBP51 und FKBP52 untersucht.

Western-Blot-Analysen mit Gesamtzelllysaten von einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie zeigen eine gleichstarke Expression von HSP90 (s. 4.7.1., Abb. 11, Spur 1+2). Auch wenn die Zelllysate mit dem monoklonalen Antikörper gegen HSP90 und ProteinG-Agarose präzipitiert wurden, konnte eine gleichstarke Expression vom HSP90-Protein in „good“- und „poor-responder“-Zelllinien nachgewiesen werden (s. 4.7.1., Abb. 11, Spur 3-6). Erfolgt Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen die zwei Isoformen α und β , so zeigte sich im Western-Blot bei beiden Zelllinien mehr HSP90-Protein im Komplex mit hGR α (s. 4.7.1., Abb. 12, Spur 1+3). Demnach würde die hGR α -Isoform bei den eingesetzten „good“- und „poor-responder“-Zelllinien mehr HSP90 binden als die hGR β -Isoform. Die Bindung von HSP90 an die Ligandenbindungsdomäne des hGR ermöglicht eine Konformationsänderung des hGR, sodass seine steroidbindende Domäne „freigelegt“ wird (PRATT & TOFT, 1997). Da nur die hGR α -Isoform die Fähigkeit besitzt Steroide zu binden, ist es biologisch sinnvoll, dass mehr HSP90-Protein mit hGR α komplexiert vorliegt.

Neben HSP90 ist auch FKBP51 als Chaperon dem hGR-Komplex assoziiert. Die Bindung dieser Peptidyl-Prolyl-Isomerase an HSP90 erfolgt über „Tetratricopeptidrepeats“(TPRs) (SCHEUFLER et al., 2000). Das Protein FKBP51 wurde in Gesamtzelllysaten bei „poor“- und „good-responder“-Zelllinien gleichstark exprimiert vorgefunden (s. 4.7.2., Abb. 13). Nach Immunpräzipitationen mit hGR α -Antikörpern in Lysaten von „poor“- und „good-responder“-Zelllinien wurde eine unterschiedliche Menge an FKBP51-Protein im Komplex mit hGR α im Western-Blot (s. 4.7.2., Abb. 14) in beiden Zelllinien festgestellt. Erfolgte keine Dexamethasoninduktion vor der Zelllyse, so wurde im Immunpräzipitat der „poor-

responder“-Zelllinie weniger FKBP51-Protein in Verbindung mit hGR α nachgewiesen (s. 4.7.2., Abb. 14, Spur 1) als im Präzipitat der „good-responder“-Zelllinie (s. Abb. 14, Spur 3). Wurden die Zellen mit Dexamethason vorinkubiert, so verhielt es sich umgekehrt: im Immunpräzipitat der „poor-responder“-Zelllinie trat das FKBP51-Protein vermehrt auf (s. Abb.14, Spur 3) als im Immunpräzipitat der „good-responder“-Zelllinie (s. Abb. 14, Spur 4). Untersuchungen zur Aktivierung des hGR zeigen, dass im hGR-Heterokomplex nach einer Induktion mit Dexamethason das Immunophilin FKBP51 durch FKBP52 ersetzt und dadurch der hGR aktiviert wird und über eine Interaktion mit Dynein zum Zellkern gelangen kann (DAVIS et al., 2002). Eigene Untersuchungen bestätigen dieses Postulat: Nach Dexamethasoninduktion nimmt in der „good-responder“-Zelllinie die Menge an FKBP51-Protein ab (Abb.14, Spur 3+4). Warum in der „poor-responder“-Zelllinie die Menge an FKBP51-Protein nach Dexamethasongabe zunimmt und nicht gleichbleibend ist, ist nicht bekannt. Dem FKBP51-Protein wird zudem eine inhibitorische Funktion bei der Bindungsaffinität des GR zum Dexamethason zugesprochen (DENNY et al., 2000). Im Komplex mit hGR α konnte mehr FKBP51-Protein im Immunpräzipitat einer „poor-responder“-Zelllinie nachgewiesen werden als in einer „good-responder“-Zelllinie (s. 4.7.2., Abb. 15). Untersuchungen zur Bindungsaffinität des GC zum hGR könnten Aufschluss darüber geben, ob das vermehrte Auftreten von FKBP51-Protein eine geringere Bindungsaffinität bei poor-respondern bewirken würde.

Ein weiteres Immunophilin, das FKBP52, soll eine Verbindung zwischen dem GR-HSP90-Heterokomplex und cytoplasmatischem Dynein, ein Motorprotein, das für den Kerntransport von GR über Mikrotubuli notwendig ist, vermitteln (GALIGNIANA et al., 2001). Nach Immunpräzipitationen mit hGR α -Antikörpern konnte weder in Lysaten von der „poor-responder“- als auch von der „good-responder“-Zelllinie das FKBP52-Protein nachgewiesen werden (s. 4.7.2., Abb. 16, Spur 1+3). Wurden die Lysate beider Zelllinien mit hGR β -Antikörpern präzipitiert, war in beiden Zelllinien das FKBP52-Protein vertreten (s. Abb.16, Spur 2+4). Der Western-Blot zeigt, dass FKBP52-Protein in Abwesenheit von Dexamethason allein mit der beta-Isoform des hGR komplexiert vorlag. In Abwesenheit von Dexamethason lag das FKBP52-Protein sowohl bei der „good“- als auch bei der „poor-responder“-Zelllinie von alpha-Isoform ungebunden vor. Erfolgten Immunpräzipitationen mit hGR α -Antikörpern bei „good“- und „poor-responder“-Zelllinien, die zuvor mit Dexamethason induziert wurden, konnte in den verwendeten Zelllinien kein FKBP52-Protein nachgewiesen werden.

Nach Dexamethasoninduktion trat im Western-Blot in den Immunpräzipitaten mit hGR β -Antikörpern das FKBP51-Protein in der „good“- und „poor-responder“-Zelllinie gleichstark

auf (s. Abb.17, Spur 1+2). Das FKBP52-Protein wurde in beiden Zelllinien nach Dexamethasoninduktion nur sehr schwach detektiert (s. Abb.17, Spur 3+4). Eine Erklärung wäre, dass das FKBP52-Protein nach der Induktion mit Dexamethason mit dem GR-Komplex in den Nucleus transportiert wurde und daher über eine Immunpräzipitation mit CHAPS-Puffer nicht detektiert werden konnte. Immunhistochemische Experimente könnten darüber Aufschluss geben, ob FKBP52 möglicherweise in den Zellkern transportiert wurde. Neben immunhistochemischen Untersuchungen müssen zukünftig weitere Chaperone untersucht werden, die ebenfalls im hGR-Heterokomplex eine wichtige Rolle spielen, wie Hop („hsp organizing protein“), p23, HSP40 und HSP70.

5.8 Phosphorylierung des hGR und des Immunophilins FKBP52

Phosphorylierung von Rezeptoren ist ein genereller Regulationsmechanismus in Zellen. Der hGR kann N-terminal an multiplen Serinresten phosphoryliert werden. Dieser Prozess ist hormonabhängig; in Abwesenheit von Steroidhormonen ist der basale Anteil von phosphoryliertem hGR niedrig, nach Dexamethasongabe wird der hGR hyperphosphoryliert (BODWELL et al., 1998). WANG et al. (2002) postuliert, dass je nachdem welcher Serinrest phosphoryliert wird, der hGR cytoplasmatisch oder nucleär vorliegen kann: liegt Serin 203 phosphoryliert vor, ist der hGR vorwiegend im Cytoplasma, wird Serin 211 phosphoryliert, findet man den hGR vermehrt im Nucleus vor. Weiterhin soll der Phosphorylierungsstatus des hGR vom Zellzyklus abhängig sein: basale Phosphorylierung ist in der S-Phase niedrig und in der G2/M-Phase hoch, bei der Hyperphosphorylierung ist es umgekehrt (BODWELL et al., 1998). BODWELL postuliert zudem, dass die Sensitivität vom hGR zu Glucocorticoiden (GC) auch vom Zellzyklus abhängig ist: in der G2/M-Phase soll der hGR resistent gegenüber GC, in der späten G1- und S-Phase hingegen sensitiv für GC sein. Weiterhin wird der hGR durch Phosphorylierung destabilisiert, so dass sich seine Halbwertszeit verkürzt. Eine klinische Relevanz des Phosphorylierungsgrades des hGR ist nicht bekannt. Mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Serin wurden Immunpräzipitationen durchgeführt und das Präzipitat in einem SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western-Blot konnte eindeutig der hGR bei good- und poor-respondern, die nicht mit Dexamethason behandelt wurden, identifiziert werden (s. 4.8., Abb. 18, Spur 1+3). Erfolgte zuvor eine Dexamethasonbehandlung, wurde in beiden Zelllinien der hGR mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Serin nicht mehr nachgewiesen (s. 4.8., Abb. 18, Spur 2+4). Nur bei Abwesenheit von Dexamethason konnte demnach der hGR im phosphoryliertem Zustand sowohl in der „good“- als auch in der „poor-responder“-

Zelllinie detektiert werden. Eine durch Dexamethason eingeleitete Hyperphosphorylierung des hGR scheint zumindest an Serinresten nicht stattgefunden zu haben. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu BODWELL et al. (1998), der postuliert, dass der hGR erst nach Dexamethason-Induktion verstärkt phosphoryliert wird. Zusätzlich in Erscheinung trat ein unbekanntes Protein mit einer Größe von ca. 50-60 kD, das in Spur 1, 2+4 (s. 4.8., Abb. 18) nachgewiesen wurde. Auffallend war, dass dieses phosphorylierte Protein im Immunpräzipitat der „good-responder“-Zelllinie, die nicht mit Dexamethason induziert wurde, nicht vorhanden war. Weitere Immunpräzipitationen haben ausgeschlossen, dass es sich bei dem unbekanntem Protein um phosphoryliertes FKBP52 handelt. Aussagen zur Lage des phosphorylierten Serinrests beim hGR konnten mit dem verwendeten Antikörper nicht getroffen werden. Somit ist nicht bekannt, ob Ser 203 und/oder Ser 211 im hGR phosphoryliert vorliegt und ob die gleichen Serinreste bei der „good“- und der „poor-responder“-Zelllinie phosphoryliert werden. Immunpräzipitationen mit FKBP52-Antikörpern und anschließende Hybridisierung mit P-Serin-Antikörpern im Western-Blot zeigten innerhalb der „good-responder“-Zelllinie keinen Unterschied im Phosphorylierungsgrad von FKBP52, unabhängig davon, ob eine Dexamethasoninduktion erfolgte (s. 4.8, Abb.19, Spur 3+4). Der Phosphorylierungsgrad des FKBP52-Proteins in der „poor-responder“-Zelllinie, die keine Dexamethasoninduktion erhielt (Abb. 19, Spur 1), fiel hingegen etwas geringer aus als der in der „poor-responder“-Zelllinie, die zuvor mit Dexamethason induziert wurde (s. 4.8, Abb. 19, Spur 2).

5.9 Polymorphismen und somatische Mutationen des hGR-Gens

Durch molekulargenetische Untersuchungstechniken konnten verschiedene Veränderungen im hGR-Gen als mögliche Ursache der Glucocorticoid-Resistenz nachgewiesen werden. Zum einen wurden Punktmutationen, d.h. Austausch einzelner Basen gefunden, die zu einem Aminosäureaustausch im hGR-Protein führen. Da dieser Austausch im Ligandenbindungsbereich des hGR lokalisiert ist, resultiert daraus eine verminderte Bindungsaffinität des hGR (HURLEY et al., 1991; MALCHOFF et al., 1993). Zum anderen konnte das Fehlen mehrerer Nukleotide im Exon 6 des hGR, eine sogenannte Microdeletion, aufgedeckt werden, welche dazu führt, dass ein hGR-Allel nicht exprimiert wird, und es somit zu einer etwa 50%igen Reduktion der hGR-Dichte pro Zelle kommt (KARL et al., 1993). Neben somatischen Mutationen wurden zahlreiche Polymorphismen beschrieben, die keinen Effekt auf die hGR-Funktion ausübten (FENG et al., 2000; KOPER et al., 1997). Der Polymorphismus N363S, der in 3-6% der Bevölkerung auftritt, führt zu einer verstärkten GC-

Sensivität (LIN et al., 1999). Diese Patienten hätten auch bei Verabreichung von geringeren GC-Dosen eine sehr gute Prognose und GC-Nebenwirkungen, wie das Cushing-Syndrom, Übergewicht, Depressionen und Knochennekrose könnten vermieden werden.

Genetische Alteration	GC-Sensitivität	Referenz
<u>Polymorphismen</u>		
<i>Gesunde Personen:</i>		
Doppelte Mutation Codon 22+23	unverändert	Tissing et al., 2001
F29L	unverändert	Longui et al., 2000
L112F	unverändert	Longui et al., 2000
D233N	unverändert	Longui et al., 2000
K293K	unverändert	Longui et al., 2000
N363S	erhöht	Lin et al., 1999
Intron 3: 46 Nucleotide oberhalb von Exon 4: G-C	unverändert	Tissing et al., 2001
Intron 4: 16 Nucleotide oberhalb von Exon 5: G-C	unverändert	Tissing et al., 2001
D677D	unverändert	Longui et al., 2000
Codon 766: Asn-Asn	unverändert	Longui et al., 2000
<u>Somatische Mutationen</u>		
<i>Patienten mit GC-Resistenz:</i>		
R477H	vermindert	Oakley et al., 1999b
I559N	vermindert	Tissing et al., 2001
Δ4 nt Deletion Exon 6	vermindert	Lin et al., 1999
D641V	vermindert	Hillmann et al., 2000
G679S	vermindert	Oakley et al., 1999b
V729I	vermindert	Hollenberg et al., 1985
<i>Patienten mit ALL:</i>		
L753F	vermindert	Hecht et al., 1997; de Castro et al., 1996

Tab. 5: Polymorphismen und somatische Mutationen im Glucocorticoidrezeptor-Gen bei gesunden Personen, einem Patienten mit kindlicher ALL und GC-resistenten Patienten

5.10 Glutathion und Glutathion S-Transferase

Eine weitere Ursache von Resistenz gegenüber zahlreichen Zytostatika kann ein hoher Glutathion-Gehalt und eine Überexpression von Glutathion S-Transferase sein. In einer Studie von 1994 beschrieb MAUNG et al. eine positive Korrelation zwischen dem Glutathion-Gehalt und der GC-Resistenz in leukämischen Zellen von 21 ALL-Patienten. Eine weitere Studie mit 62 ALL-Patienten konnte diese Aussage nicht bestätigen, es wurde aber eine positive Korrelation zwischen einem erhöhten Glutathion-Gehalt und der Rezidivrate von ALL-Patienten postuliert (KEARNS et al., 2001). Polymorphismen im Glutathion S-Transferase-Gen können ebenfalls Ursache für eine unterschiedliche GC-Sensitivität sein (ANDERER et al., 2000). Die Studie mit 45 *in vivo* „poor respondern“ und 90 „good-respondern“ zeigte, dass das Risiko des Nichtansprechens auf GC bei ALL-Patienten mit einer homozygoten Glutathion S-Transferase-1 (Null Genotyp) geringer ist. Anzumerken ist, dass die publizierten Werte statistisch nicht signifikant waren ($P=0,071$).

Ausblick:

GC-sensitive und GC-resistente Zelllinien sind ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der GC-Resistenz bei ALL. Mit ihnen kann die Komplexität der Aktivierung des hGR und seine Translokation zum Nucleus auch zukünftig untersucht werden und weitere Veränderungen in der Reaktionskaskade des hGR wären eine Erklärung für unterschiedliche GC-Sensitivitäten. Nach erfolgreicher Aktivierung wirkt der hGR als Transkriptionsfaktor und aktiviert und/oder reprimiert zahlreiche Zielgene, die wiederum entscheiden, ob eine Zelle apoptotisch wird oder nicht. Es ist wichtig, in der Zukunft diese Zielgene zu identifizieren, deren Funktion zu charakterisieren und den Mechanismus, der entscheidet, wann ein GC-sensitives Gen transaktivierend oder transreprimierend wirkt, aufzuklären.

6. Zusammenfassung:

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Mechanismen zu leisten, die zu einer Glucocorticoid (GC)-Resistenz bei Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) führen. Mögliche Ursachen dafür könnten Störungen in der Expression und/oder Funktion des Glucocorticoidrezeptors (GR), eine verminderte intrazelluläre GC-Konzentration und/oder eine fehlende GC- und Zytostatika-induzierte Apoptose sein. Als Modellsystem dienten GC-resistente und sensible Zelllinien und Primärzellen von ALL-Patienten, mit denen Funktionsanalysen des GR mit biochemischen und molekulargenetischen Methoden durchgeführt wurden.

Die Möglichkeit, ob das unterschiedliche Ansprechen kindlicher ALL auf GC-Therapie auf unterschiedliche Mengen an GR-mRNA in den Lymphoblasten zurückzuführen ist, wurde mittels kompetitiver RT-PCR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der GR-mRNA-Spiegel in den mononukleären Zellen (MNZ) des Knochenmarks und des peripheren Blutes bei ALL-Patienten im Vergleich zu den MNZ aus peripherem Blut gesunder Kontrollpersonen um den Faktor 4-8 vermindert ist. Darüberhinaus wurde die GR-mRNA-Menge in den MNZ des peripheren Blutes von ALL-Patienten analysiert, die auf eine GC-Therapie gut ansprechen („good-responder“) und von leukämischen Patienten, deren Ansprechbarkeit auf GC gering ausfiel („poor-responder“). Man findet bei „poor-responder“ einen um Faktor 2 verminderten GR-mRNA-Spiegel.

Internalisierungsexperimente mit ³H-Dexamethason zeigen, dass die „poor-responder“-Zelllinie im Vergleich zur „good-responder“-Zelllinie GC verzögert aufnimmt und die Endkonzentration bei poor-respondern tendenziell geringer ist.

Um zu untersuchen, ob die Reaktionskaskade des GR bei poor-respondern gestört ist, wurde ein Assay etabliert, mit dem Reporteragen-Analysen durchgeführt werden konnten. Dazu wurden zwei „good“- und „poor-responder“-Zelllinien und 16 Primärzellkulturen mit einem Plasmid transient transfiziert, welches den auf GC reagierenden Sequenzabschnitt, das sogenannte GRE, einen Dexamethason-induzierbaren Promotor und als Reporteragen die sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP) enthält. Es konnte gezeigt werden, dass die „poor-responder“-Zelllinie das Reporteragen SEAP um den Faktor 8 geringer exprimiert als die „good-responder“-Zelllinie. Reporteragen-Analysen mit transfizierten Primärzellkulturen

von 16 ALL-Patienten zeigten bei poor-respondern eine signifikant geringere Expression des Reportergens SEAP im Vergleich zu den good respondern (Median: poor-responder= 1235 RLU (n=8); good-responder=2715 RLU (n=8); p=0,002). Diese Ergebnisse zeigen erstmalig eine Verbindung zwischen einer veränderten hGR-Reaktionskaskade und dem Ansprechen auf GC von „good“- und „poor-responder“-ALL-Patienten.

Da der GR zwei Isoformen besitzt ($\alpha+\beta$), und nach einer Hypothese Heterodimere als dominant negativer Inhibitor wirken können, wurde diese Hypothese durch Bestimmung des GR α/β -Verhältnisses überprüft. Western-Blot-Analysen deuten auf eine geringere Expression von GR α gegenüber GR β in einer „poor-responder“-Zelllinie im Vergleich zu einer „good-responder“-Zelllinie hin.

Mithilfe von Immunpräzipitationen wurde die Aktivierung des hGR-Komplex bei „good“- und „poor-responder“-Zelllinien untersucht. Es zeigten sich Unterschiede bei der Interaktion zwischen den hGR-Isoformen $\alpha+\beta$ mit Chaperon HSP90 und dem Immunophilin FKBP51 bei good- und poor-respondern: Erfolgt Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen beide Isoformen α und β , so zeigte sich im Western-Blot in beiden Zelllinien mehr HSP90-Protein in Verbindung mit der hGR α -Isoform als im Komplex mit hGR β . Nach Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen hGR α in Lysaten von „poor“- und „good-responder“-Zelllinien konnte ein quantitativer Unterschied von FKBP51-Protein im Western-Blot in beiden Zelllinien festgestellt werden. Der hGR wurde in Abwesenheit von Dexamethason in einer „good“- und einer „poor-responder“-Zelllinie gleichstark phosphoryliert vorgefunden. Nach Dexamethasoninduktion scheint in beiden Zelllinien eine Hyperphosphorylierung des hGR auszubleiben. Der Phosphorylierungsgrad des FKBP52-Proteins in einer „poor-responder“-Zelllinie, die keine Dexamethasoninduktion erhielt, war geringer als der in einer „poor-responder“-Zelllinie, die zuvor mit Dexamethason behandelt wurde. Innerhalb der „good-responder“-Zelllinien wurden keine Unterschiede im Phosphorylierungsstatus der Serinreste des FKBP52-Proteins ersichtlich. Weiterhin wurde bei den Immunpräzipitationen ein unbekanntes phosphoryliertes Protein detektiert, das durch zukünftige, weitere Untersuchungen identifiziert werden sollte. Die meisten der bisher gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Reaktionskaskade des Glucocorticoidrezeptors bei „poor-responder“ verändert ist und somit eine der Ursachen von GC-Resistenz bei ALL sein könnte.

Summary:

The initial response to glucocorticoid (GC) in ALL treatment identifies good-(~90% of patients) and poor-responders (~10% of patients) who have a significantly different long-term disease free survival. Possible explanations for non-responsiveness could be a reduced expression of the glucocorticoid receptor (GR), a disturbed GR reaction pathway or an imbalanced expression between the GR isoforms.

To analyze mononuclear cells (MNC) responding differently to GC a quantitative reverse transcription (RT)-PCR assay was established to measure GR-mRNA level in peripheral blood mononuclear cells (MNC, mostly lymphoblasts) and bone marrow samples from ALL-patients. The results showed a decrease of GR-mRNA concentration in MNC from peripheral blood of ALL-patients which is 4 to 8-fold lower compared to the level found in normal peripheral blood MNC. In contrast, the GR-mRNA levels in MNC from bone marrow showed no significant difference. The level of GR-mRNA in peripheral blood MNC of good responders was moderately higher (0.064 ± 0.019 fmol/100 ng RNA) compared with poor responders (0.035 ± 0.01 fmol/100 ng RNA).

In addition the uptake of $^3\text{[H]}$ -dexamethasone in established lymphoblast cell lines was analyzed. The good-responder cell line internalized 2-fold more $^3\text{[H]}$ -dexamethasone (20330 cpm, 60 min uptake 20 nM ^3H -Dex) than the poor-responder cell line (10906 cpm, 60 min uptake 20 nM ^3H -Dex). Studies with transport inhibitors such as verapamil and genistein gave no hint for an increased active outward transport in poor-responder ALL blasts.

The GC signaling pathway involves binding of the steroid hormone to its receptor in the cytoplasm, translocation of the activated complex into the nucleus and binding to its cognate site, the glucocorticoid response element (GRE). Each step of this cascade reaction may be a target for dysfunction in cells of ALL-patients. In order to compare the GR reaction cascade as well as the GR function in MNC of good- and poor-responders a transient transfection reporter gene assay was established. For this assay the pGRE-SEAP vector was used containing a GRE enhancer fused to the HSV-TK promoter and the coding sequence of the secreted alkaline phosphatase (SEAP) as reporter gene. The assay revealed a 8-fold decreased amount of the reporter SEAP in a poor-responder cell line compared to the good-responder cell line. In leukemic blasts of 16 ALL-patients a significant lower expression of SEAP in lymphoblasts of poor-responders (mean:1235 RLU) was measured compared with good-responders (mean:2715 RLU; $p=0.002$). These results point to an alteration of the GR reaction cascade possibly caused by reduced binding of GR homodimer to the GRE.

Alternative splicing of the GR gene generates a non-hormone binding splice variant (GR β) that differs from the wild-type receptor (GR α) at the carboxyl terminus. GR β can heterodimerize with ligand-bound GR α , translocates into the nucleus and can inhibit the effects of hormone-activated GR α homodimer. Therefore the ratio between the two GR isoforms in MNC of good- and poor-responder cell lines was investigated by western blot analysis. The results showed an increased expression of GR β compared to GR α in a poor-responder cell line, which may induce resistance to GC in cells of ALL-patients.

In conclusion the reaction to GC is disturbed on different cellular levels in ALL patients with a poor prednisone response. In MNC of peripheral blood of poor responders a reduced GR-mRNA level and a decreased intracellular GC content in a poor responder cell line was measured. Furthermore the results demonstrate for the first time an altered GR reaction cascade in ALL lymphoblasts with poor GC response.

7. Literaturverzeichnis

- Anderer G., Schrappe M., Brechlin A.M., Lauten M., Muti P., Welte K., Stanulla M. (2000): Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics* 10: 715-726.
- Arico M., Basso G., Mandelli F., Rizzari C., Colella R., Barisone E., Zanesco L., Rondelli R., Pession A. Masera G. (1995): Good steroid response in vivo predicts a favorable outcome in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 75: 1684-1693.
- Babu J.S., Kanangat S., Rouse B.T. (1993): Limitations and modifications of quantitative polymerase chain reaction. *J. Immunol. Methods* 165: 207-216.
- Bamberger C.M., Bamberger A.M., de Castro M., Chrousos G.P. (1995): Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 95: 2435-2441.
- Barnes P.J. (1998): Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci* 94: 557-572.
- Beato M., Arnemann J., Chalepakis G., Slater E., Willmann T. (1987): Gene regulation by steroid hormones. *J. Steroid. Biochem.* 27: 9-14.
- Beato M. (1989): Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344.
- Beato M., Herrlich P, Schütz G. (1995): Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851-857.
- Becker-André M., Hahlbrock K. (1989): Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). *Nucl. Acids Res.* 17: 9437-9440.
- Birnboim H.C., Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 11: 3939-3958.
- Bloemena E., Weinreich S., Schellekens P.T. (1990): The influence of prednisolone on the recirculation of peripheral blood lymphocytes in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 80: 460-466.
- Bloomfield C.D., Munck A.U., Smith K.A. (1984): Glucocorticoid receptor levels predict response to treatment in human lymphoma. In: *Hormones and cancer*. Hrsg: Guripide E., Galandra R., Levy C, Soto R.J. AR Liss, New York, S. 223-233.
- Bodwell J.E., Webster J.C., Jewell C.M., Cidrowski J.A., Hu J.M., Munck A. (1998): Glucocorticoid receptor phosphorylation : overview, function and cell-cycle dependence. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65: 91-99.
- den Boer M.L., Pieters R., Kazemier K.M., Rottier M.M., Zwaan C.M., Kaspers G.J., Janka-Schaub G., Henze G., Creutzig U., Scheper R.J., Veerman A.J. (1998): Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. *Blood* 91: 2092-2098.

- Bourgeois S., Gruol D.J., Newby R.F., Rajah F.M. (1993): Expression of an *mdr*-gene is associated with a new form of resistance to dexamethasone-induced apoptosis. *Mol Endocrinol* 7: 840-851.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brogan I.J., Murray I.A., Cerillo G., Needham M., White A., Davis J.R. (1999): Interaction of glucocorticoid receptor isoforms with transcription factors AP-1 and NF-kappaB: lack of effect of glucocorticoid receptor beta. *Mol Cell Endocrinol* 157: 95-104.
- Burnstein K.L., Jewell C.M., Cidlowski J.A. (1990): Human glucocorticoid receptor cDNA contains sequences sufficient for receptor down-regulation. *J Biol Chem* 265: 7284-7291.
- de Castro M., Elliot S., Kino T., Bamberger C., Karl M., Webster E., Chrousos G.P. (1996): The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol Med* 2: 597-607.
- Champlin R. (1991): The leukemias. In: Harrison's principals of internal medicine. Hrsg: Wilson, Braunwald, Isselbacher, Petersdorf, Martin, Fanci, Root, 12.Aufl., Mc Graw-Hill, New York, 1552-1561.
- Chelly J., Kaplan J.-C., Maere P., Gautron S., Kahn A. (1988): Illegitimate transcription of any gene. *Nature* 33: 858-860.
- Chomczynski P., Qasba P., Topper Y.J. (1986): Transcriptional and posttranscriptional roles of glucocorticoid in the expression of the rat 25.000 molecular weight casein gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 812-818.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.
- Cidlowski J.A., Bellingham D.L., Powell-Oliver F.E., Lubahn D.B., Sar M. (1990): Novel antipeptide antibodies to the human glucocorticoid receptor: recognition of multiple receptor forms in vitro and distinct localization of cytoplasmatic and nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 4: 1427-1437.
- Costlow M.E., Pui C.H. (1987): Nuclear translocation of lymphoblast glucocorticoid receptors in childhood leukemia does not predict steroid responsiveness. *J Steroid Biochem* 26: 15-18.
- Dahlman-Wright K., Wright A., Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J.(1991): Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J. Biol. Chem.* 266: 3107-3112.
- Dalman F.C., Scherrer L.C., Taylor L.P., Akil H., Pratt W.B.(1991): Localization of the 90-kDa heat-shock protein-binding site within the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition. *J. Biol. Chem.* 266: 3482-3490.

- Davis T.H., Ning Y.M., Sanchez E.R. (2002): A first new step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J. Biol. Chem.* 277: 4597-4600.
- Defranco D.B. (2000): Role of molecular chaperones in subnuclear trafficking of glucocorticoid receptors. *Kidney Int* 57: 1241-1249.
- Denis M., Gustafsson J.A., Wikström A.C. (1988): Interaction of the Mr=90.000 heat shock protein with the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 18.520-18.523.
- Denis M., Gustafsson J.A. (1989): The Mr=90.000 heat shock protein: An important modulator of ligand and DNA-binding properties of the glucocorticoid receptor. *Cancer Res. (suppl.)* 49: 2275-2281.
- Denny W.B., Valentine D.L., Reynolds P.D., Smith D.F., Scammell J.G. (2000): Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. *Endocrinology* 141: 4107-4113.
- Devlin M.E., Gilden D.H., Mahalingham R., Dueland A.N., Cohrs R. (1992): Periphial blood mononuclear cells of the elderly contain Varicella-Zoster virus DNA. *J. Infect. Disease.* 165: 619-620.
- Distelhorst C.W. (1989): Recent insight into the structure and function of the glucocorticoid receptor. *J. Lab. Clin. Med.* 113: 404-412.
- Encio I.J., Detera-Wadleigh S.D. (1991): The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 266: 7182-7188.
- Evans R.M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
- Evans R.M. (1989): Molecular characterization of the glucocorticoid receptor. *Recent Prog. Horm. Res.* 45: 1-22.
- Feng J., Zheng J., Bennett W.P., Heston L.L., Jones I.R., Craddock N., Sommer S.S. (2000): Five missense variants in the amino-terminal domain of the glucocorticoid receptor: no association with puerperal psychosis or schizophrenia. *Am J Med Genet* 96: 412-417.
- Fuchs R., Blakesley R. (1983): Guide to use of type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* 100: 3-38.
- Fulton R., Birnie GD. (1985): Post-transcriptional regulation of rat liver gene expression by glucocorticoids. *Nucleic Acids Res.* 13: 6467-6482.
- Fuxe K, Wikström A.C., Okret S., Agnati L.F., Harfstrand A., Yu Z.Y., Granholm L., Zoli M., Vale W., Gustafsson J.A. (1985): Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against the rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 117: 1803-1812.
- Gagliardo R., Chanez P., Vignola A.M., Bousquet J., Vachier J., Godard P., Bonsignore G., Demoly P., Mathieu M. (2000): Glucocorticoid receptor alpha and beta in glucocorticoid dependent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 7-13.

- Galanaud P., Emilie D. (1990): Regulation de la production des anticorps par les monokines et les glucocorticoides. *Pathol. Biol. Paris* 38: 43-46.
- Galigniana M.D., Radanyi C., Renoir J.M., Housley P.R., Pratt W.B. (2001): Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J Biol Chem* 276: 14884-14889.
- Gehring U., Segnitz B., Foellmer B., Francke U. (1985): Assignment of the human gene for the glucocorticoid receptor to chromosome 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3751-3755.
- Gerdes K., Beger C., Lauten M., Fernandez-Munoz I., Tissing W.J.E., Pieters R., Welte K., Schrappe M. (2001): Quantification of the glucocorticoid receptor and its splice variant gamma in childhood acute lymphoblastic leukemia using real-time PCR. *Blood* 98: 113a (Abstr.).
- Giguere V., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G., Evans R.M (1986): Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46: 645-652.
- Gilliland G., Perrin S., Blanchard K., Bunn H.F. (1990): Analysis of cytokin mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2725-2729.
- Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J., Poellinger L., Okret A., Wikström A.C., Brönnegard M., Gillner M., Dong Y., Fuxe K., Cintra A., Härfstrand A., Agnati L. (1987): Biochemistry, molecular biology and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocrine Rev.* 8: 185-234.
- Gustafsson J.A., Wikström A.C., Denis M. (1989): The non-activated glucocorticoid receptor: Structure and activation. *J. Steroid Biochem.* 34: 53-62.
- Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J., Strömstedt P.E., Wikström A.C., Denis M., Okret S., Dong Y. (1990): Structure, function and regulation of the glucocorticoid receptor. *Progr. Clin. Biol. Res.* 322: 65-80.
- Haarman E.G., Kaspers G.J.L., Pieters R., Rottier M.M.A., Veerman A.J.P. (2002): Temperature dependence of glucocorticoid receptor ligand binding. *Leukemia* (in press).
- Hamid Q.A., Wenzel S.E., Hauk P.J., Tsiopoulos A., Wallaert B., Lafitte J.J., Chrousos G.P., Szeffler S.J., Leung D.Y. (1999): Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1600-1604.
- Hecht K., Carlstedt-Duke J., Stierna P., Gustafsson J., Brönnegard M., Wikström A.C. (1997): Evidence that the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor does not act as a physiologically significant repressor. *J Biol Chem* 272: 26659-26664.
- Hennig H. (1997): Quantifizierung des Glucocorticoidrezeptors in normalen und leukämischen Lymphozyten und Lymphoblasten. Diplomarbeit, unveröffentlicht.
- Hennig H., Kugler W., Griesinger F., Schrappe M., Eber S.W. (2000): Reduced dexamethasone uptake by lymphoblasts and weakened glucocorticoid receptor reaction cascade is associated with a poor response to glucocorticoids in treatment of acute

- lymphoblastic leukemia (ALL). Am Soc of Hematol 42th meeting, San Francisco, CA. Blood Vol 96;11
- Hillmann A.G., Ramdas J., Multanen K., Norman M.R., Harmon J.M. (2000): Glucocorticoid receptor gene mutations in leukemic cells acquired *in vitro* and *in vivo*. Cancer Res. 60: 2056-2062.
- Ho A.D., Hunstein W., Ganeshaguru K., Hoffbrand A.V., Brandeis W., Denk B.(1982): Therapeutic and prognostic implications of glucocorticoid receptors and terminal deoxynucleotidyl transferase in acute leukemia. Leuk. Res. 6: 1-8.
- Höck W., Martin F., Jaggi R., Groner B. (1989): Regulation of glucocorticoid receptor activity. J. Steroid Biochem. 34: 71-78.
- Hollenberg S.M., Weinberger C., Ong E.S., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson E.B, Evans R.M. (1985): Primary structure and expression of a functional human GR cDNA. Nature 318: 635-641.
- Hollenberg S.M., Giguere V., Segui P., Evans R.M. (1987): Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. Cell 49: 39-46.
- Hollenberg S.M., Giguere V., Evans R.M. (1989): Identification of two regions of the human glucocorticoid receptor hormone binding domain that block activation. Cancer Res. (suppl.) 49: 2292-2294.
- Homo F., Duval D., Harousseau J.L., Marie J.P., Zittoun R. (1980): Heterogeneity of the *in vitro* responses to glucocorticoids in acute leukemia. Cancer Res. 40: 2601-2608.
- Honda M., Orii F., Ayabe T., Imai S., Ashida T., Obera T., Kohgo Y. (2000): Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. Gastroenterology 118: 859-866.
- Hurley D.M., Accili D., Stratakis C.A., Karl M., Vamvakopoulos N., Rorer E., Constantine K., Taylor S.I., Chrousos G.P. (1991): Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. J. Clin. Invest. 87: 680-686.
- Iacobelli S., Marchetti P., De Rossi G., Mandelli F.(1984): Glucocorticoid receptors and steroid sensitivity of human acute lymphoblastic leukemia. In: Gurpide E., Calandra R., Levy C., Soto R.J.(eds) Hormones and cancer. AR Liss, New York, pp 235-246.
- Kalinyak J.E., Dorin R.I., Hoffman A.R., Perlman A.J. (1987): Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone. J. Biol. Chem. 262: 10441-10444.
- Kanelakis K.C., Morishima Y, Dittmar K.D., Galigniana M.D., Takayama S., Reed J.C., Pratt W.B. (1999): Differential effects of the hsp70-binding protein BAG-1 on glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery. J Biol Chem 274: 34134-34140.

- Karl M., Lamberts S.W.J., Detera-Wadleigh S., Encio I.J., Statakis C.A., Hurley D.M., Accili D., Chrousos G.P. (1993): Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *J. Endocrinol. Metab.* 76: 683-689.
- Karl M., Schulte HM. (1994): Familial glucocorticoid resistance as the differential diagnosis of hypercortisolism. Clinical and molecular genetic aspects. *Dtsch-Med.Wochenschr.* 119(3):74-79
- Kaspers G.J., Pieters R., Klumper E., DeWaal F.C., Veerman A.J. (1994): Glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leuk. Lymphoma.* 13: 187-201.
- Kato G.J., Quddus F.F., Shuster J.J., Boyett J., Pullen J.D., Borowitz M.J., Whitehead V.M., Christ W.M., Leventhal B.G. (1993): High glucocorticoid receptor content of leukemic blasts is a favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 82: 2304-2309.
- Kearns P.R., Pieters R., Rottier MM., Pearson A.D., Hall A.G. (2001): Raised blast glutathione levels are associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 97: 393-398.
- Kellog D.E., Sninsky J.J., Kwok S. (1990): Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by PCR. *Anal. Biochem.* 189: 202-208.
- Klock G., Strähle U., Schütz G. (1987): Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature* 329: 734-736.
- Kojika S., Sugita K., Inukai T., Saito M, Iijima K., Tezuka T., Goi K., Shiraishi K., Mori T., Okazaki T., Kagami K., Ohyama K., Nakazawa S. (1996): Mechanisms of glucocorticoid resistance in human leukemic cells: implication of abnormal 90 and 70 kDa heat shock proteins. *Leukemia* 10: 994-999.
- Koper J.W., Stolk R.P., de Lange P., Huizenga N.A., Molijn G.J., Pols H.A., Grobbee D.E., Karl M., de Jong F.H., Bringmann A.O., Lamberts S.W. (1997): Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum Genet* 99: 663-668.
- Krett N.L., Pillay S., Moalli P.A., Greipp P.R., Rosen S.T. (1995): A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. *Cancer Res* 55: 2727-2729.
- Kullmann M., Schneikert J, Moll J., Heck S., Zeiner M., Gehring U., Cato A.C. (1998): RAP46 is a negative regulator of glucocorticoid receptor action and hormone-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273: 14620-14625.
- Kwok S., Higuchi R. (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-238.
- de Lange P., Koper J.W., Bringmann A.O., de Jong F.H., Lamberts S.W. (1999): Natural variants of the beta isoform of the human glucocorticoid receptor do not alter sensitivity to glucocorticoids. *Mol Cell Endocrinol* 153: 163-168.

- de Lange P, Segeren C.M., Koper J.W., Wiemer E., Sonneveld P., Brinkmann A.O., White A., Brogan I.J., de Jong F.H., Lamberts S.W. (2001): Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res* 61: 3937-3941.
- Leung D.Y.M., Hamid Q., Vottero A., Szeffler S.J., Surs W., Minshall E., Chrousos G.P., Klemm D.J. (1997): Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med* 186: 1567-1574.
- Lin R.C.Y., Wang W.Y.S., Morris B.J. (1999): High penetrance, overweight, and glucocorticoid receptor variant: case control study. *Br Med J* 319: 1337-1338.
- Lippman M. Halterman R.H., Leventhal B.G., Perry S., Thompson E.B. (1973): Glucocorticoid-binding proteins in human acute lymphoblastic leukemic blast cells. *J. Clin. Invest.* 53: 1715-1725.
- Lippman M., Barr R. (1977): Glucocorticoid receptors in purified subpopulations of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 118: 1977-1981.
- Longui C.A., Vottero A., Adamson P.C., Cole D.E., Kino T., Monte O., Chrousos G.P. (2000): Low glucocorticoid receptor alpha/beta ratio in T-cell lymphoblastic leukemia. *Horm Metab Res* 32: 401-406.
- Mahoney D.H, jr. (1994): Acute lymphoblastic leukemia in childhood. In: *Principals and practise of pediatrics*, Hrsg: Oski, DeAngelis, Feigen, McMillan, Warshaw, 2.Aufl., Lippencott Comp., Philadelphia, S.1701-1710.
- Malchoff D.M., Brufsky A., Reardon G.E., McDermott P.E., Javier E.C., Bergh C.H., Rowe D., Malchoff C.D. (1993): A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance. *J. Clin. Invest.* 91: 1918-1925.
- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M. (1995): The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83: 835-839.
- Maung Z.T., Hogarth L., Reid M.M., Proctor S.J., Hamilton P.J., Hall A.G. (1994): Raised intracellular glutathione levels correlate with *in vitro* resistance to cytotoxic drugs in leukaemic cells from patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 8: 1487-1491.
- Mc Ewen B.S., Weiss J.M., Schwartz L.S. (1968): Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220: 911-912.
- Miossec P. (1992): Cytokine abnormalities in inflammatory arthritis. *Baillieres Clin. Rheumatol.* 6: 373-392.
- Moalli P.A., Pillay S., Krett N.L., Rosen S.T. (1993): Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 53: 3877-3879.

- Munck A., Brinck-Johnsen T. (1968): Specific and nonspecific physicochemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells in vitro. *J. Biol. Chem.* 243: 5556.
- Newton C.R., Graham A. (1994): In: PCR. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, S.53-58.
- Oakley R.H., Sar M., Cidlowski J.A. (1996): The human glucocorticoid receptor β isoform. *J. Biol. Chem.* 271: 9550-9559.
- Oakley R.H., Jewell C.M., Yudit M.R., Bofetiado D.M., Cidlowski J.A. (1999 a): The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 274:27875-27866.
- Oakley R.H., Webster J.C., Jewell C.M., Sar M., Cidlowski J.A. (1999 b): Immunocytochemical analysis of the glucocorticoid receptor alpha isoform (GR alpha) using GR alpha-specific antibody. *Steroids* 64: 742-751.
- Okret S., Poellinger L., Dong Y., Gustafsson J.A. (1986): Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5899-5903.
- Paek I., Axel R.(1987): Glucocorticoids enhance the stability of human growth hormone mRNA. *Mol. Cell.Biol.*7: 1496-1507.
- Piatak M., Ka-Cheung L., Williams B., Lifson J.D. (1993): Quantitative competitive PCR for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques* 14: 70-79.
- Picard D., Yamamoto K.R. (1987): Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6: 3333-3340.
- Picard D., Salser S.J., Yamamoto K.R. (1988): A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* 54: 1073-1080.
- Pieters R., den Boer M.L., Durian M., Janka G., Schmiegelow K., Kaspers G.J., van Wering E.R., Veerman A.J. (1998): Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia-implications for treatment of infants. *Leukemia* 12: 1344-1348.
- Pratt W.B. (1993): The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268: 21455-21458.
- Pratt W.B. & Toft D.O. (1997): Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Rev.* 18: 306-360.
- Pui C.H. & Costlow M.E. (1986): Sequential studies of lymphoblast glucocorticoid receptor levels at diagnosis and relapse in childhood leukemia: an update. *Leuk. Res.*10: 227-229.
- Rao G.A. (1981): Mode of entry of steroid and thyroid hormones into cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 21: 97-108.

- Rajapandi T, Greene L.E., Eisenberg E. (2000): The molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 275: 22597-22604.
- Ray D.W., Davis J.R.E., White A., Clark A.J.L. (1996): Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 56: 3276-3280.
- Reiter A., Schrappe M., Ludwig W.D., Hiddemann W., Sauter S., Henze G., Zimmermann M., Lampert F., Havers W., Niethammer D., Odenwald E., Ritter J., Mann G., Welte K., Gadner H., Riehm H. (1994): Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusion of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 84: 3122-3133.
- Rexin M., Busch W., Segnitz B., Gehring U., (1992): Structure of the glucocorticoid receptor in intact cells in the absence of hormone. *J. Biol. Chem.* 267: 9619-9621.
- Riehm H., Schrappe M., Ludwig W.D., Harbott J., Reiter A. (1995): Risk adapted treatment in childhood ALL: Data from the β FM group. *Annals of Hematol. Suppl. II Vol. 70: A* 103.
- Rivers C., Levy A., Hancock J., Lightman S., Norman M. (1999): Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4283-4286.
- Rosewicz S., McDonald A.R., Maddux B.A., Goldfine I.D., Miesfeld R.L., Logsdon C.D. (1988): Mechanism of glucocorticoid receptor down-regulation by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 263: 2581-2584.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.M., Horn G.T., Ehrlich H.A., Arnheim N. (1985): Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Schaumburg B.P., Bojesen E. (1968): Specificity and thermodynamic properties of the corticosteroid binding to a receptor of rat thymocytes in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 170: 172.
- Scheidereit C., von der Ahe D., Cato A.C., Wenz M., Suske G., Carlson C., Bosshard H., Westphal H.M., Beato M. (1989): Protein-DNA interactions at steroid hormone regulated genes. *Endocrinology Res.* 15: 417-440.
- Scheufler C., Brinker A., Bourenkov G., Pegoraro S., Moroder L., Bartunik H., Hartl F.U., Moarefi, I. (2000): Structure of TPR domain-peptide complexes: critical element in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101: 199-210.

- Schleimer R.P., Jacques A., Shin H.S., Lichtenstein L.M., Plaut M. (1984): Inhibition of T cell-mediated cytotoxicity by anti-inflammatory steroids. *J. Immunol.* 132: 266-271.
- Schmidt U., Wochnik G.M., Rosenhagen M.C., Young J.C., Hartl F.U., Holsboer F., Rein T. (2002): Essential role of the unusual DNA binding motif of BAG-1 for inhibition of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 278: 4926-4931.
- Schrapppe M., Arico M., Harbott J., Biondi A., Zimmermann M., Conter V., Reiter A., Valsecci M.G., Gadner H., Basso G., Bartram C.R., Lampert F., Riehm H., Masera G. (1998): Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: Good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood* 92: 2730-2741.
- Segeren C.M., Sonneveld P., de Lange P., Wiemer E., Koper J.W., van Zon A., de Jong F.H. Lamberts S.W.J. (1999): Molecular mechanisms of therapy resistance in multiple myeloma: the role of the non-functional glucocorticoid receptor delta. *Blood* 94: 593a (Abstr.).
- Siebert P.D., Larrick J.W. (1992): Competitive PCR. *Nature* 359: 557-558.
- Smith K., Shuster S. (1987): Characterization of the glucocorticoid receptor in human epidermis and dermis. *Clin. Exp. Dermatol.* 12: 83-88.
- Smith K.A., Crabtree G.R., Kennedy S.J., Munck A.U. (1977): Glucocorticoid receptors and glucocorticoid sensitivity of mitogen stimulated and unstimulated human lymphocytes. *Nature* 267: 523-526.
- Straus D.S. (1988): Growth of IM-9 human lymphoblasts in serum-free medium: stimulation by glucocorticoids. *Cell Tissue Kinet.* 21: 115-122.
- Suggs S.V., Hirose T., Miyake T., Kawashima E.H., Johnson M.J., Itakura K.I., Wallace R.B. (1981): Use of synthetic oligodesoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. In: *Developmental biology using purified genes* (D.D. Brown; ed.). Academic Press, New York, USA: S. 683-693.
- Svec F., Rudis M. (1981): Glucocorticoids regulate the glucocorticoid receptor in the AtT-20 Cell. *J. Biol. Chem.* 256: 5984-5987.
- Svec F. (1990): The effect of a low concentration of ATP on the glucocorticoid receptor: evidence for a novel form of the receptor. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 43: 65-74.
- Tao Y., Williams-Skipp C., Scheinman R.I. (2001): Mapping of glucocorticoid receptor DNA binding domain surfaces contributing to transrepression of NF-kappa B and induction of apoptosis. *J Biol Chem* 276: 2329-2332.
- Thein S.L., Wallace R.B. (1986): The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: *Human Genetic Diseases: A practical approach*. Ed.: K.E. Davis. Herndon, VA: IRL Press.
- Theriault A., Boyd E., Harrap S.B. et al. (1989): Regional chromosomal assignment of the human glucocorticoid receptor gene to 5q31. *Hum.Genet.* 83: 289-291.

- Thomas P.S. (1980): Hybridization of denaturated RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201-5205.
- Thompson E.B. (1987): The structure of the human glucocorticoid receptor and its gene. J. Steroid Biochem. 27: 105-108.
- Tissing W.J.E., Lauten M., Meijerink J.P.P., den Boer M.L., Verschuuren A.C., Gerdes K., Beger C., Wiemer E.A.C., Sonneveld P., Welte K., Schrappe M., Pieters R. (2001): Glucocorticoid receptor splice variants alpha, beta and GR-P and *in vivo* glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 98: 313a (Abstr.).
- Tissing W.J.E., Meijerink J.P.P., den Boer M.L., Pieters R. (2003): Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 17: 17-25.
- Ueda K., Kino K., Taguchi Y., Yamada K., Saeki T., Tanigawara Y., Komano T. (1996): Role of P-glycoprotein in the transport of hormones and peptides. In: Gupta S., Tsoruo T.: Multidrug resistance in cancer cells. John Wiley&Sons; Chichester: 303-319.
- Vacca A., Martinotti S., Screpanti I., Maroder M., Felli M.P., Farina A.R., Gismondi A., Santoni A., Frati L. (1990): Transcriptional regulation of the interleukin 2 gene by glucocorticoid hormones. Role of steroid receptor and antigenresponsive 5'-flanking sequences. J. Biol. Chem. 265: 8075-8080.
- Van den Berg J.D., Smets L.A., Van den Elshout M.M., Van Geel I.P., Janssen M. (1993): Temperature dependence of glucocorticoid binding in sensitive and refractory murine leukaemia cells. Leuk. Res. 17: 263-269.
- Vedeckis W.V., Ali M., Allen H.R. (1989): Regulation of glucocorticoid receptor protein and mRNA levels. Cancer Res. 49 (8 Suppl.): 2220s-2221s.
- Wallace D.M. (1987): Large- and small-scale phenol extractions. Methods Enzymol. 152:33-41.
- Wang A.M., Doyle M.V., Mark D.F. (1989): Quantitation of mRNA by the the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9717-9721.
- Wang Z., Frederick J., Garabedian M.J. (2002): Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor *in vivo*. J Biol. Chem. 277: 26573-26580.
- Weiss C., Ho A.D., Hiller E., Thiel E., Schlag R., Lipp T., Herrmann R., Musch E., Termander B., Hunstein W. (1990): Prognostic significance of glucocorticoid receptor determination in patients with chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma-lack of positive correlation between receptor levels and clinical responsiveness. Leuk. Res. 14: 327-332.
- Wuchter C., Karawajew L., Ruppert V., Schrappe M., Harbott J., Ratei R., Dorken B., Ludwig W.D. (2000): Constitutive expression levels of CD95 and Bcl-2 as well as CD95 function and spontaneous apoptosis *in vitro* do not predict the response to induction chemotherapy and relapse rate in childhood acute lymphoblastic leukemia. Br J Haematol 110: 154-160.

Zanker B., Walz G., Wieder K.J., Strom T.B. (1990): Evidence that glucocorticosteroids block expression of the human interleukin-6 gene by accessory cells. *Transplantation* 49: 183-185.

Herrn Prof. Dr. S. Eber möchte ich besonders für die Überlassung des Themas, für die guten Arbeitsmöglichkeiten in der Universitäts-Kinderklinik Göttingen, die Fachgespräche und Anregungen für diese Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. R. Hardeland danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und seine Bereitschaft, als Referent diese Arbeit vor dem Fachbereich Biologie der Georg-August-Universität Göttingen zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. D. Doenecke danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn PD Dr. F. Griesinger danke ich für die freundliche Aufnahme und die guten Arbeitsmöglichkeiten in der Abt. Hämatologie/Onkologie, Zentrum Innere Medizin.

Dem Graduiertenkolleg „Molekularbiologische Analyse pathophysiologischer Prozesse“ und besonders Prof. Dr. E. Günther sei für mein Stipendium, die Unterstützung von Tagungsreisen, anregende Diskussionen und die nette Atmosphäre im Kolleg gedankt.

Herrn Prof. Dr. Welte (Kinderklinik, Medizinische Hochschule Hannover) danke ich für die Überlassung der Zelllinien und dem Zellmaterial vieler Patienten.

Für die Möglichkeit Messungen am Luminometer durchzuführen, möchte ich mich bei PD Dr. T. Kietzmann (Abt. Biochemie I) bedanken.

Bei allen ehemaligen Mitarbeitern im hämatologischen Labor der Kinderklinik und allen jetzigen Mitarbeitern in der Hämatologie/Onkologie (Innere Medizin) bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit sowie das angenehme Arbeitsklima.

Tammo Bartnick, Julie Schanz und Antje Fuß danke ich für ihre professionelle Hilfe bei der Erstellung von Abbildungen.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei meiner Familie, meinen Freunden und besonders bei Ingrid für ihre stetige Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Heike Hennig
geb. am 29.03.1968 in Wilhelmshaven

Schulbildung:

1974-1987 Grundschule, Orientierungsstufe, Gymnasium Wilhelmshaven
05/1987 Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung und wissenschaftlicher Werdegang:

10/1987-10/1989 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin (BTA)
an der staatl. anerkannten Berufsfachschule B.Blindow in Bückeberg

12/1989-02/1990 Mitarbeiterin am Institut für Vogelforschung "Vogelwarte Helgoland"
(Prof. Dr. J. Nicolai) in Wilhelmshaven

03/1990-10/1990 Anstellung als BTA am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht (Prof. Dr.
Dr. G. Brem) der Ludwig Maximilians-Universität München

10/1990 Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen im
Fachbereich Biologie (Diplom)

03/1991-04/1991 Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie (Prof. Dr. E.-L.
Winnacker) der LMU München

10/1992 Diplomvorprüfung in den Fächern: Zoologie, Mikrobiologie,
Anorganische Chemie und Physikalische Chemie

07/1995-08/1997 Experimentelle Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S.
Eber, Abt. Hämatologie der Universitätskinderklinik, Göttingen

02/1998 Diplomhauptprüfung in den Fächern : Entwicklungsbiologie,
Immunologie und Geographie

04/1998-03/2001 Stipendiatin des Graduiertenkollegs "Molekularbiologische Analyse
pathophysiologischer Prozesse" und Beginn der Arbeiten zur
vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Eber,
Abt. Hämatologie der Universitätskinderklinik Göttingen

04/2000-10/2001 Fortführung der Dissertation in der Arbeitsgruppe von PD Dr. F.
Griesinger Abt. Hämatologie/Onkologie, Zentrum Innere Medizin,
Universitätsklinik Göttingen in Kooperation mit Prof. Dr. S. Eber,
Kinderspital, Zürich

seit 11/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abt. Hämatologie/Onkologie
des Zentrums für Innere Medizin des Universitätsklinikums Göttingen