

Weißensee **Verlag** 

[Zurück zur Homepage des Weißensee Verlags](#)

**Auszug aus dem Buch**

**Autor:**

**Irina Spika**

**Titel:**

**Genaktivierung und Repression von Transkriptionsfaktoren durch  
topische Glucocorticoide**

**Berliner Beiträge zur Pharmazie [ISSN 1611-0536], Bd. 2**

**ISBN 3-934479-86-3**

**Erschienen im Weißensee Verlag**

**Genaktivierung und  
Repression von Transkriptionsfaktoren  
durch topische Glucocorticoide**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde  
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Irina Spika**

aus Ulm

Berlin 2002

1. Gutachter: Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting
2. Gutachter Herr Privatdozent Dr. Burkhard Kleuser

Datum der Disputation: 21.11.02

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von  
Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting  
in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie  
des Instituts für Pharmazie  
der Freien Universität Berlin angefertigt.

Für meine Familie

---

Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting danke ich sehr herzlich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, die wissenschaftlichen Anregungen, die ständige Gesprächsbereitschaft und ihre fördernde Unterstützung.

Bei Herrn PD Dr. Burkhard Kleuser möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Eule, Herrn Dr. Jung, Herrn Dr. Knoblauch und Herrn Dr. Schildknecht für die Überlassung des Gewebematerials zur Zellgewinnung.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Jürgen Willert, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin, für die Anleitung bei der Plasmidamplifizierung.

Frau Hannelore Gonska danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Zellkultivierung, und bei Frau Barbara Brüggener bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei der Erstellung der Formeln.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting möchte ich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die vielen gemeinsamen Aktivitäten danken. Mein besonderer Dank gilt Frau Stefanie Hammer für die sehr gute Zusammenarbeit als Glucocorticoidgruppe und die persönliche Freundschaft, Herrn PD Dr. Burkhard Kleuser für die wissenschaftlichen Diskussionen, Frau Ulrike Trier für die Motivation und Betreuung zu Beginn der Promotion sowie Frau Dr. Annekathrin Haberland und Herrn Uwe Münster für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der Kommission zur Vergabe von Promotionsstipendien des Landes Berlin sowie beim Berliner Programm zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre sehr bedanken.

---

<b>1</b>	<b>EINFÜHRUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Entzündliche Hauterkrankungen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Atopische Dermatitis.....	1
1.1.2	Therapie.....	3
<b>1.2</b>	<b>Glucocorticoide.....</b>	<b>4</b>
1.2.1	Wirkungen.....	4
1.2.2	Strukturen.....	5
<b>1.3</b>	<b>Glucocorticoidrezeptoren.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4</b>	<b>Mechanismen der Signaltransduktion.....</b>	<b>9</b>
1.4.1	Transaktivierung.....	10
1.4.2	Transrepression.....	13
<b>1.5</b>	<b>Dissoziierte Glucocorticoide.....</b>	<b>17</b>
<b>1.6</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Medien und Puffer.....</b>	<b>24</b>
2.2.1	Zellkulturmedien.....	24
2.2.2	Lösungen zur Isolierung von Hautzellen.....	25
2.2.3	Lösungen für die Plasmidamplifizierung.....	26
2.2.4	Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.2.5	Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	27
2.2.6	Puffer für die Westernblot-Analyse.....	27
2.2.7	Lösungen für den MTT-Test.....	28
2.2.8	Lösungen zur Proteinbestimmung.....	28
<b>2.3</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4</b>	<b>Vektorstrukturen.....</b>	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>Molekularbiologische Techniken.....</b>	<b>32</b>
2.5.1	Herstellung transformationskompetenter Zellen.....	32
2.5.2	Plasmidamplifizierung in E. coli.....	32
2.5.3	Plasmidpräparation.....	33
2.5.4	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	33
2.5.5	Restriktionsanalyse.....	34

---

2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	34
<b>2.6</b>	<b>Kultivierung eukaryontischer Zellen.....</b>	<b>34</b>
2.6.1	Isolierung und Kultivierung von Keratinozyten.....	34
2.6.2	Isolierung und Kultivierung von Fibroblasten.....	35
2.6.3	Kultivierung von COS-7-Zellen .....	35
2.6.4	Kryokonservierung von Zellen .....	36
2.6.5	Zelldichtebestimmung .....	36
2.6.6	MTT-Test.....	36
<b>2.7</b>	<b>Transfektionen.....</b>	<b>37</b>
2.7.1	Transfektion mit Calciumphosphat.....	37
2.7.2	Transfektion mit Lipofektamin.....	37
2.7.3	Transfektion mit Fugene.....	38
<b>2.8</b>	<b>HPLC-Analytik.....</b>	<b>38</b>
2.8.1	Probengewinnung und –aufarbeitung.....	38
2.8.2	Chromatographische Bedingungen.....	39
<b>2.9</b>	<b>Methoden zur Charakterisierung von Proteinen.....</b>	<b>39</b>
2.9.1	Proteinbestimmung nach Bradford .....	39
2.9.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.9.3	Western Blot .....	41
<b>2.10</b>	<b>Stimulation der Transkription.....</b>	<b>42</b>
<b>2.11</b>	<b>Reporter-Gen-Tests zur Messung der transkriptionellen Aktivität.....</b>	<b>42</b>
2.11.1	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Test (CAT-Test).....	43
2.11.2	Luciferase-Test.....	44
2.11.3	Renilla-Luciferase-Test .....	45
2.11.4	$\beta$ -Galactosidase-Test.....	46
<b>2.12</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Expressionsplasmide.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2</b>	<b>Transfektionen.....</b>	<b>50</b>
3.2.1	Transfektion von COS-7-Zellen .....	50
3.2.2	Transfektion von Keratinozyten und Fibroblasten.....	53
<b>3.3</b>	<b>Nachweis des Glucocorticoidrezeptors.....</b>	<b>55</b>
<b>3.4</b>	<b>Metabolisierung von Glucocorticoiden in COS-7-Zellen.....</b>	<b>57</b>

---

3.4.1	Metabolisierung von Prednicarbat .....	57
3.4.2	Metabolisierung von P17EC .....	58
<b>3.5</b>	<b>Transaktivierung.....</b>	<b>60</b>
3.5.1	Etablierung des CAT-Tests.....	60
3.5.2	Glucocorticoid-abhängige Aktivierung der Transkription .....	63
<b>3.6</b>	<b>Transrepression.....</b>	<b>70</b>
3.6.1	Transrepression in COS-7-Zellen .....	70
3.6.2	Transrepression in Hautzellen .....	78
<b>3.7</b>	<b>Korrelation von Bindungsaffinität, Transaktivierung und Transrepression.....</b>	<b>91</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
4.1	Einfluss der Metabolisierung.....	93
4.2	Methoden.....	94
4.2.1	Reportergen-Tests.....	94
4.2.2	Transfektionen.....	97
4.3	Stimulation der Transkription.....	99
4.4	Transaktivierung und Transrepression .....	99
4.5	Einfluss von Prednicarbat .....	103
4.6	Dissoziierte Effekte.....	105
4.7	Posttranskriptionelle Mechanismen .....	106
4.8	Ausblick.....	107
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>113</b>

---

# 1 Einführung

## 1.1 Entzündliche Hauterkrankungen

Glucocorticoide besitzen einen äußerst hohen Stellenwert in der Therapie entzündlicher Hautkrankheiten. Beispielhaft seien das atopische Ekzem (Neurodermitis), das allergische Kontaktekzem, das kumulativ-toxische Kontaktekzem, Photodermatosen oder die Psoriasis vulgaris genannt. Auf das Krankheitsbild der atopischen Dermatitis sowie deren Therapie soll im folgenden näher eingegangen werden.

### 1.1.1 Atopische Dermatitis

Atopie wird heute als familiär gebundene Überempfindlichkeit der Haut und Schleimhäute gegenüber Umweltfaktoren definiert, die mit erhöhter IgE-Synthese und/oder veränderter unspezifischer Reaktivität einhergeht (Wüthrich et al., 1997). Unter atopischer Dermatitis (AD) versteht man eine chronisch-rezidivierende entzündliche Hautkrankheit, die als allergische Reaktion gegen verschiedene exogene Substanzen aufgefasst werden kann und oft in Kombination mit Asthma und/oder allergischer Rhinitis auftritt (Buske-Kirschbaum et al., 1998; Gustafsson et al., 2000). Die Krankheit wird vor allem bei Kindern und Jugendlichen beobachtet und betrifft ca. 10-15,6 % der Bevölkerung mit steigender Prävalenz (Schultz-Larsen et al., 1996; Wüthrich, 1999). Das atopische Ekzem zeichnet sich durch trockene Haut, Lichenifikationen sowie ekzematöse Entzündungsherde aus und geht mit einem starken Juckreiz einher, wobei die vorherrschenden Symptome mit dem Lebensalter variieren. Die Pathogenese der AD ist noch nicht vollständig geklärt, doch sind neben der genetischen Disposition offenbar Klima, Umweltstoffe, erhöhte Irritabilität der Haut, veränderte vaskuläre Reaktivität oder psychosozialer Stress wichtige Faktoren (Buske-Kirschbaum et al., 1998). Als Ursache der Sebstase gilt ein Mangel an  $\gamma$ -Linolensäure infolge eines  $\delta$ -6-Desaturasedefektes, wobei der gestörte Lipidstoffwechsel die Barrierefunktion der Haut erheblich beeinträchtigt (Wüthrich et al., 1997).

Neuere Untersuchungen deuten auf eine Störung immunologischer Prozesse hin, die sich in einer Dysregulation von T-Zellen sowie einer Hypersekretion von IgE manifestiert, allerdings zeigen ca. 20 % der Atopiker keine allergenspezifische Sensibilisierung (Wüthrich et al., 1997). IgE-vermittelte Reaktionen führen zur Degranulation von Mastzellen und zur Freiset-

zung von Entzündungsmediatoren, die wiederum die Rekrutierung zusätzlicher inflammatorischer Zellen wie T-Zellen und eosinophile Granulozyten veranlassen (Kapp, 1993).

Kürzlich wurde gezeigt, dass Langerhanszellen – immunologisch kompetente Zellen des Hautorgans – hochaffine Fc-Rezeptoren für IgE exprimieren und somit als IgE-positive Zellen Antigene prozessieren und präsentieren können. Dies führt bei Atopikern bevorzugt zu einer Aktivierung von Th2-Lymphozyten, welche daraufhin IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren, wodurch B-Zellproliferation und IgE-Synthese sowie die Hochregulation von IgE-Rezeptoren auf Langerhans-Zellen ausgelöst werden (Holden et al., 1998). Bei peripheren Lymphozyten von Patienten mit AD dominieren Th2-Zellen, die Zahl der Th1-Zellen ist reduziert (Teraki et al., 2000). Dies resultiert in einer vermehrten Sekretion von IL-13 und IL-4 sowie einer erheblich gesteigerten Expression des IL-4-Rezeptors (Akdis et al., 1997; Renz et al., 1992). Außerdem wird in nur geringem Ausmaß das Th1-sezernierte Interferon- $\gamma$  produziert, welches die Th2-Antwort und die IgE-Synthese inhibiert (Campbell et al., 1999). Interessanterweise findet sich Interferon- $\gamma$  jedoch in Biopsien chronischer Läsionen von AD-Patienten (Akdis et al., 1999), und transgene Mäuse, welche das Interferon- $\gamma$ -Gen in der Epidermis exprimieren, entwickeln spontan Ekzeme (Carroll et al., 1997). Untersuchungen zur Bedeutung der Apoptose bei der AD weisen auf eine entscheidende Rolle von Interferon- $\gamma$  bei der Induktion des Zelluntergangs von Keratinozyten hin. IL-5 dagegen fördert die Differenzierung und das Überleben von eosinophilen Zellen, und IL-4 übt einen zellschützenden Effekt auf T-Lymphozyten in der Haut aus (Trautmann et al., 2001). Dabei ist das Zytokinprofil der Hautläsionen von AD-Patienten durch eine erhöhte Bildung von IL-4, IL-5 und IL-13 mRNA, also entsprechend den Mediatoren der Th2-Zellen, gekennzeichnet (Hamid et al., 1994; Hamid et al., 1996).

Eine zusätzliche Störung des Zytokingehalts der Haut entsteht durch juckreizbedingtes Kratzen, das Keratinozyten zur Sekretion von IL-1 und nachfolgend zur Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TGF $\alpha$ , IL-3, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF und M-CSF sowie Adhäsionsmolekülen (Tomic-Canic et al., 1998) anregt, was wiederum zu einer Rekrutierung und Aktivierung von T-Lymphozyten führt. Infiltrierende T-Zellen bilden große Mengen an kutanem Lymphozytenantigen (CLA), welches als Ligand für das Adhäsionsmolekül E-Selectin fungiert und so die Leukozyten-Extravasation in die Haut ermöglicht (Rossiter et al., 1997; Wakite et al., 1994). Dieser Vorgang ist in Abb. 1 dargestellt.