

**EINFLUSS DER HISTON DEACETYLASE 6 AUF DEN
GLUCOCORTICOID REZEPTOR-
VERMITTELTEN GLUCOSESTOFFWECHSEL**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Robin Max Winkler

aus Dresden

September 2011

Erster Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kintscher

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Datum der Disputation: 12.01.2012

Danksagung

Zunächst möchte ich einen besonderen Dank an Ulrich Kintscher richten, der mir die Forschungstätigkeit an einem hochaktuellen Thema an einem hervorragenden Institut ermöglicht hat. Der ständigen Möglichkeit an Kongressen und Foren teilzunehmen sowie neue Forschungsideen zeitnah in die Tat umzusetzen und seinem regen geistigen Input habe ich meine geistige Entwicklung sowie die dieser Arbeit zu verdanken.

Herrn Matthias Melzig möchte ich besonders für die Betreuung dieser Arbeit seitens des Pharmazeutischen Fachbereichs danken. Die ständige und mitunter auch sehr kurzfristige Bereitschaft sich Fortschritte der Arbeit anzusehen und sich damit auseinanderzusetzen waren mir ein sehr hilfreicher Rückhalt.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an meine Familie richten, die mir mit sehr viel Humor, ständiger moralischer Unterstützung, ein wenig Druck und den nötigen finanziellen Mitteln überhaupt erst den Weg in die Forschung ermöglicht hat.

Die Arbeit über die vergangenen drei Jahre am CCR hat bisweilen sehr viel Energie gekostet. Die Frustration war manchmal groß, die Resultate mitunter klein, die eine oder andere Nachtschicht wurde eingeschoben und ein längerer Aufenthalt im Ausland blieb auch nicht aus. Umso mehr wusste und weiß ich die Unterstützung meines langjährigen Kommilitonen und Freundes Sami Wardat und der allzeit gut gelaunten Verena Benz zu schätzen. Ob dabei die unzähligen fachlichen Diskussionen oder die kurzweilige, gelegentlich sicher weniger geistreiche Ablenkung zwischendurch wichtiger waren, vermag ich nicht zu sagen. Kaffchen?

Ohne Mandy Bloch und Markus Clemenz würden viele der hier veröffentlichten Ergebnisse gar nicht vorhanden sein, sondern noch als Versuchsskizze an der Plantafel stehen. Eine unterschiedlichere Arbeitsweise zweier Forscher kann ich mir kaum

vorstellen, umso weniger noch, dass mich jemand besser in die Welt der molekularbiologischen Methoden hätte einführen können, als diese beiden.

An für sich gebührt dem ganzen Center for Cardiovascular Research mein Dank, angefangen beim Institutsleiter Thomas Unger, ohne den es dieses Institut so nicht geben würde, über Frau Sprang, die mit ihrer Erfahrung, ihrem fachlichen Wissen, ihrem ruhigen aber bestimmten Auftreten und trockenen Humor so einige brenzlichen Situationen zu entschärfen vermochte und mir immer noch Rätsel aufgibt, wie man sich zeitgleich um eine solche Anzahl von Versuchen kümmern kann bis hin zu Frau Marschalky, die meist die einzige Gesellschaft morgens vor 7 war und die Labore hervorragend vor Kontaminasen und Wollmäusen bewahrte.

Besonders möchte ich mich auch bei meine Arbeitsgruppenmitstreitern Beata Thalke, Anna Foryst-Ludwig, Lena Herbst, Christian Böhm und Ilse Bähr sowie Michael Schupp und Nicole Witte, Pawel Namsolleck, Sabrina Klare, Sebastian Kirsch, Miranda Schröder und dem allseits präsenten Wayne bedanken. Ihr alle habt einen wesentlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen – DANKE!

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Originalarbeiten

R Winkler, M Clemenz, M Bloch, A Foryst-Ludwig, J Spranger, G Matthias, T Roloff, O Truee, P Matthias, U Kintscher Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Is an Essential Modifier of Glucocorticoid-Induced Hepatic Gluconeogenesis. *Diabetes*. 2011 Dec 30 [Epub ahead of print]

Vorträge

R Winkler, M Clemenz, M Bloch, A Foryst-Ludwig, G Matthias, O Truee, P Matthias, U Kintscher Modulating Glucocorticoid Receptor Translocation in the Liver – Therapeutic Relevance for HDAC6? 46. Jahrestagung der DDG Juni 2011; *Diabetologie & Stoffwechsel* 2011; 6: S1–S103

R Winkler, M Clemenz, M Bloch, A Foryst-Ludwig, G Matthias, O Truee, P Matthias, U Kintscher HDAC6 – A New Regulator of Glucocorticoid Receptor-Mediated Processes. 2. Hypertension Summer School September 2010, Trensbüttel

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Histone und Histondeacetylasen (HDAC).....	1
1.1.1	Histone.....	1
1.1.2	Histondeacetylasen (HDAC) / Lysin-deacetylasen (KDAC).....	2
1.1.3	HDAC6	5
1.1.4	HDAC Inhibitoren	9
1.1.5	Tubacin als HDAC6 selektiver Inhibitor.....	12
1.2	Glucocorticoide.....	14
1.2.1	Endogene Glucocorticoide	14
1.2.2	Exogene Glucocorticoide.....	15
1.2.3	Der Glucocorticoidrezeptor – Struktur, Ligandeninteraktion, Wirkung.....	17
1.2.4	Erwünschte und unerwünschte Wirkungen	21
1.3	Zusammenhang HDAC6 und GR via HSP90	25
1.4	Zielstellung	28
2	Material und Methoden	30
2.1	Material.....	30
2.1.1	Laborgeräte.....	30
2.1.2	Chemikalien und Substanzen.....	31
2.1.3	Versuchstiere und Zelllinien	33
2.1.4	Material Tierversuch	33
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	34

2.1.6	Western Immunoblotting.....	39
2.1.7	Kits.....	40
2.1.8	Medien und Zellkultur	40
2.1.9	Primer und Assay on Demand.....	43
2.1.10	Vektoren	44
2.2	Methoden.....	44
2.2.1	Tierversuch.....	44
2.2.2	In vivo.....	44
2.2.3	Ex vivo	46
2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	55
2.2.6	Zellkulturtechniken und Transfektionen	62
2.2.7	Statistische Berechnungen	63
3	Ergebnisse.....	64
3.1	HDAC6 Expression in unterschiedlichem Gewebe	64
3.2	Der HDAC6-Einfluss auf die hepatische ligandeninduzierte Glucocorticoidrezeptortranslokation.....	66
3.3	Der HDAC6-Einfluss auf die hepatische Genexpression	69
3.4	Die Rolle von HDAC6 im glucocorticoidinduzierten Glucosestoffwechsel der Leber	72
3.5	HDAC6-Einfluss auf glucocorticoid-induzierte diabetogene Effekte.....	77
3.5.1	Labmaster	77
3.5.2	Gewichtsentwicklung.....	79
3.5.3	Nüchtern glucose und Glucosetoleranz.....	80

3.5.4	Seruminsulin und Serumcorticosteron.....	81
3.5.5	Insulinsensitivität.....	83
3.6	Anti-inflammatorische Effekte von Dexamethason bei HDAC6-Defizienz.....	86
3.6.1	Genexpression in peripheren mononukleären Zellen	87
3.6.2	Inflammationsmarker im Serum	88
4	Diskussion.....	90
4.1	Hepatische Corticosteroid-induzierte nukleäre GR-Translokation und Gentranskriptionsregulation.....	90
4.2	Tubacin	93
4.3	Die hepatische Gluconeogenese.....	93
4.4	Glucocorticoidvermittelte diabetogene Stoffwechsellage	95
4.5	Glucocorticoidvermittelte Zytokinsuppression.....	97
4.6	Ausblick	99
5	Zusammenfassung	101
6	Summary	103
7	Literaturverzeichnis	105

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Akt	Proteinkinase B
AP-1	Activator Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BCA	Bicinchoninsäure
CBP	Creb-bindendes Protein
COX2	Cyclooxygenase 2
CRH	Corticotropin-releasing hormone
CRM1	Exportin-1
CYP3A4	Cytochrom P450 Isoenzym 3A4
DD	Deacetylase Domäne
dex	Dexamethason
DMB	Dyneinbindende Domäne
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBP	Fructose 1,6-Bisphosphatase
FBS	fetales bovines Serum
FDA	US Food and Drug Administration
G6P	Glucose 6-Phosphatase
GLUT4	Glucose Transporter 4
GR	Glucocorticoid Rezeptor
GRE	Glucocorticoid response element
GRU	Glucocorticoid response unit
GTT	Glucose Toleranztest
HAT	Histon Acetyltransferase
HDAC	Histon Deacetylase
HDACi	Histon Deacetylase Inhibitor
HHNR	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde
HNF4	hepatocyte nuclear factor 4
Hop	Hsp70-Hsp90 organizing protein
HSP	Hitzeschock Protein
IFN-g	Interferon gamma
IL10	Interleukin 10
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL6	Interleukin 6

ip	intraperitoneal
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ITT	Insulin Toleranztest
K	Lysin
KDAC	Lysin Deacetylase
MEF	Maus embryonale Fibroblasen
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NBD	(ATP) Nukleotidbindende Domäne
NES	Nuclear Exclusion Signal
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
nGRE	negative Glucocorticoid response element
NLS	Nuclear translocation signal
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAGE	Polyacryl Gelelektrophorese
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCX	Pyruvatcarboxylase
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PLA2	Phospholipase A2
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative real time Polymerase Kettenreaktion
RER	Respiratory Exchange Ratio
RIA	Radioimmunoassay
RQ	Respiratorischer Quotient
SAHA	Suberoylanilidhydroxamsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEGRA	selektive Glucocorticoid Rezeptor Agonisten
SGK1	Serum- / Glucocorticoid induzierte Proteinkinase 1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TSA	Trichostatin A
veh	Vehikel (isotonische Kochsalzlösung)
ZBG	Zinkbindende Gruppe
ZnF-UBP	Zinkfinger-Ubiquitinbindende Domäne

1 EINLEITUNG

1.1 Histone und Histondeacetylasen (HDAC)

1.1.1 Histone

Im menschlichen Zellkern findet sich DNA mit einer Gesamtlänge von circa zwei Metern. Diese gilt es so zu verknäueln, dass sie zum einen in den Zellkern passt, zum anderen immer noch jederzeit zugänglich und ablesbar bleibt. Um dies zu bewerkstelligen liegt die DNA in der Zelle mit Histonproteinen assoziiert, als Chromatin vor. Das eukaryotische Chromatin besteht dementsprechend aus Nukleosomen (1). Eines dieser Nukleosomen besteht aus ungefähr 146 in superhelikaler Form gewundenen DNA-Basenpaaren, welche sich zweimal um einen Proteinoktamer wickeln. Dieses Oktamer besteht jeweils aus zwei Kopien der basischen Histone H2A, H2B, H3 und H4, wobei H3 und H4 als Tetramer vorliegen und jeweils zwei Dimere H2A/H2B angegliedert sind. Die Heterodimere werden durch große, meist hydrophobe Interaktionsstellen stabilisiert, wohingegen die Spezifität durch die komplementären Aminosäuren der beiden Untereinheiten gewährleistet ist. Jeweils zwei Nukleosomen sind durch ein Stück DNA und/oder ein gebundenes H1 Histon miteinander verbunden. Das Histon H1, welches zusätzlich den Aufbau größerer kompakter Strukturen mehrerer Nukleosomen reguliert, sowie die Nukleosomen verbindende DNA werden dementsprechend als „Linker“ bezeichnet (2,3).

Die N-terminalen Enden der Histonproteine sind die Bestandteile der Nukleosomen, die sich zwischen der und über die DNA-Superhelix hinaus erstrecken. Sie sind unter anderem zur DNA Bindung befähigt und definieren die Struktur der nukleosomalen Oberfläche, jedoch sind sie hauptsächlich für Protein-Protein-Interaktionen zuständig. Dabei sind sie wesentlicher Bestandteil der Interaktionsschnittstelle zwischen den

Heterodimeren und dem Heterotetramer des Nukleosoms (4,5). Inzwischen werden den N-terminalen Enden drei wesentliche Funktionen zugewiesen: 1. Sie modulieren die Zugänglichkeit der nukleosomalen DNA für basenspezifische Erkennung. 2. Sie dienen als Interaktionsplattform für zelluläre Faktoren und 3. Durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit vor allem benachbarten Nukleosomhistonen beeinflussen Sie den Kondensationsgrad des Chromatins (6–8).

Post-translationale, kovalente Modifizierung von Aminosäuren der N-terminalen Enden, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung, Sumoylierung, ADP-Ribosylierung oder Biotinylierung kann zu einer Beeinflussung der Funktion führen. Diese Veränderungen sind, mit Ausnahme der Methylierung, grundsätzlich reversibel und meist in einem Gleichgewicht mit ihrer Gegenreaktion. Die Summe aller Histonmodifikationen wird als Histon-Code bezeichnet. Hinter dem Histon-Code versteckt sich die Hypothese, dass verschiedene Kombinationen der Histonmodifikationen zu spezifischen Konformationen führen, die wiederum die Interaktionen mit unterschiedlichen Proteinen ermöglichen oder verhindern und/oder die Expression unterschiedlichster Gene beeinflussen (8–11).

1.1.2 Histondeacetylasen (HDAC) / Lysinacetylasen (KDAC)

Die Acetylierung stellt die am besten untersuchte Modifikation der Histone dar und findet an ϵ -ständigen Aminofunktionen von Lysinresten im N-Terminus der Histone statt. Der Acetylierungszustand der Histone wird durch zwei antagonistische Enzymklassen kontrolliert, die bereits in den 1960er Jahren entdeckt wurden: Histoneacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC), welche die Acetylierung bzw. Entfernung von Acetylgruppen katalysieren (12–14).

Die durch Acetylierung von positiv geladenen Lysinresten bedingte Negativierung der Nettoladung des Histonproteins führt zu einer potentiellen Veränderung der funktionalen Eigenschaften des Oktamers. Hierbei kann es zu einer

Nukleosomenstruktur direkt beeinflusst werden, es können Bindungsstellen für Nichthistonproteine generiert werden, welche wiederum die Eigenschaften des Chromatins beeinflussen oder die Verminderung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Histonterminus und DNA werden verringert. Das Resultat aller drei Veränderungen ist eine Auflockerung des Chromatins und eine Steigerung der transkriptionellen Aktivität. Im Gegensatz korreliert die Deacetylierung mit einer Festigung der Chromatinstruktur und Genrepression (11,15–19).

Acetylierung wird im allgemeinen mit Aktivierung der Transkription assoziiert und Faktoren mit HAT-Aktivität, wie zum Beispiel GCN5, CBP, p300 oder Tip60, wurden als Transkriptionskoaktivatoren identifiziert (15,18,20,21). Im Gegensatz dazu führt die Aktivität von HDAC überwiegend zu Genrepression. Im Menschen wurden bislang 18 verschiedene HDAC identifiziert, die anhand ihrer strukturellen Verwandtschaft zu ihren Hefehomologen in vier Klassen unterteilt werden (22,23) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Übersicht allerbekanntesten HDAC, ihr Vorkommen und ihre Eigenschaften (24–31)

Hefe	Klasse	Mensch	Lokalisation	Katalytische Domänen	Größe	Abhängigkeit
Rpd3	I	HDAC1	Ubiquitär; vorwiegend Zellkern	1	400-500 Amino- säuren (AS)	
		HDAC2				
		HDAC3				
		HDAC8				
Hda1	IIa	HDAC4	Zellkern und Zytoplasma	1	~1000 AS	Zn ²⁺
		HDAC5				
		HDAC7				
		HDAC9				
	IIb	HDAC6	vorwiegend Zytoplasma	2	2 (nur eine aktiv)	
HDAC10		Zellkern und Zytoplasma				
SIR2	III	Sirtuine 1-7	Zellkern: SIRT1,6,7	1		NAD ⁺
HOS3	IV	HDAC11	Zellkern	1	347 AS	Zn ²⁺

Bereits 1999 wurde der katalytische Mechanismus, nach dem die Deacetylierung des Acetyllysins durch Histondeacetylasen abläuft, anhand des Histondeacetylase-ähnlichen Proteins aus *Aquifex aeolicus* durch Finnin et al. aufgeklärt. Dabei kommt es zunächst zu einem nukleophilen Angriff des Acetamidcarbonylkohlenstoffes der Acetyllysinseitenkette durch ein aktiviertes Wassermolekül. Das im tetraedrischen Übergangszustand entstehende Oxyanion wird wahrscheinlich durch Zinkionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen zu Hydroxylgruppen von Tyrosinresten der Deacetylase

stabilisiert bevor im letzten Schritt der Reaktion die Stickstoff-Kohlenstoffverbindung gespalten wird und die Produkte Lysin und Acetat entstehen (32).

Da Histone die ersten identifizierten Zielstrukturen dieser Deacetylasen waren wurde die Enzymgruppe Histondeacetylasen genannt. Seit einigen Jahren werden jedoch immer mehr Substrate identifiziert, die keine Histone sind, weshalb der Begriff HDAC immer weniger treffend ist und zunehmend von Lysin-deacetylasen gesprochen wird. Da die Darstellung des Lysins im Einbuchstabencode der Aminosäuren ein K ist, werden die Deacetylasen nunmehr als KDAC bezeichnet. So wurden in einer Proteomstudie von Kim et al. eine Vielfalt von Lysin-substraten, die der Acetylierung unterliegen mit diversen zellulären Funktionen identifiziert. Dazu gehören neben den Histonen des Zellkerns auch Chaperonproteine, Regulatoren der Transkription und der Chromatinstruktur sowie Stoffwechsel-, Signal-, Zytoskelett- und eine Vielzahl mitochondrialer Proteine. Dass sich der Acetylierungsstatus nicht nur unmittelbar auf die Genexpression aufgrund der Histon- und Chromatinmodifikation auswirkt, haben diverse Studien gezeigt. Ku70, ein DNA-Reparaturprotein (33), HSP90, ein Chaperonprotein (34), p53, ein Tumorsuppressor (35,36) oder auch STAT6, ein Mitglied der Familie der STAT Transkriptionsfaktoren (37) werden in ihrer Funktion durch Acetylierung und Deacetylierung beeinflusst. Es lässt sich somit nicht mehr vereinfacht sagen, dass Acetylierung mit Gentranskription und Deacetylierung mit Genrepression einhergeht. Vielmehr werden unterschiedliche zell- und molekularbiologische Vorgänge durch Acetylierung reguliert.

1.1.3 HDAC6

Das HDAC6-Gen liegt beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 und findet sich ausschließlich auf dem X-Chromosom. Die Bezeichnung für den genauen Chromosomenbereich, in dem sich das Gen befindet, lautet Xp11.23 (38).

Das 1999 von Grozinger et al. identifizierte Enzym HDAC6 ist ein Außenseiter in der Gruppe der HDAC, da sich bisher Nichthistonproteine als Substrate herausgestellt haben (27). Als grundlegende Ursache diesbezüglich wird auf die Struktur des Enzyms verwiesen. Wie man Abbildung 1.1 entnehmen kann, weist das Protein N-terminal ein kurzes leucinreiches Motiv auf, welches ein starkes nukleäres Export Signal (NES) darstellt. Dieses Motiv wird von CRM1, einem Exportin erkannt und der Transport aus dem Nukleus initiiert. Bezeichnend für dieses Motiv enthaltende Proteine ist die transiente Präsenz im Nukleus während der Differenzierung und der Unterbrechung der Zellproliferation oder als Antwort auf spezifische Signale (39,40). Für das humane HDAC6 spezifisch ist der zytoplasmatische Anker, der sich zwischen der zweiten katalytischen Domäne und dem C-terminalen ubiquitinbindenden Zinkfinger befindet. Dieser Anker besteht aus acht aufeinander folgenden Serin-Glutamin-reichen Tetradecapeptiden und wurde daher SE14 genannt. Da der CRM1-abhängige nukleäre Export durch z.B. Leptomycin B inhibierbar ist, stellt dieses zweite Motiv, eine Sequenz zur zusätzlichen Verankerung von HDAC6 im Zytoplasma dar (41,42). Die Spezifität und Multiplizität dieser nukleären Ausschlussignale im humanen HDAC6, spricht für evolutionär bedingte Gründe HDAC6 stabil im Zytoplasma zu lokalisieren. Was die Studien von Bertos et al. und Verdel et al. ebenfalls zeigten, ist das HDAC6 keine enzymatische Deacetylaseaktivität gegenüber Histonen aufweist. Bisher wurden zwar bestätigt, dass HDAC6 in bestimmten Zelltypen wie z.B. MCF7 Zellen nukleär vorkommt, jedoch wurden bezüglich der Histondeacetylaseaktivität keine direkten funktionellen Beweise erbracht sondern lediglich korrelative Studienergebnisse veröffentlicht (40,41,43,44).

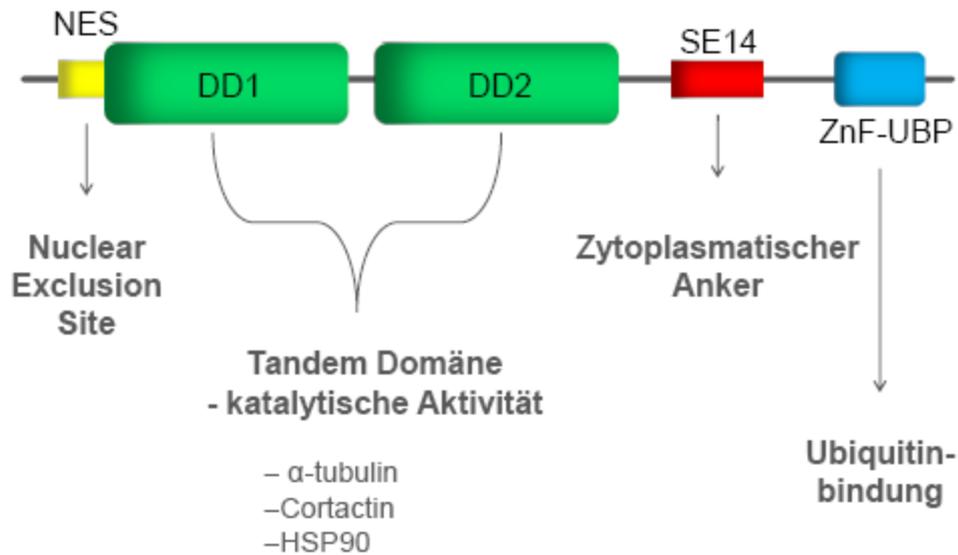


Abbildung 1.1 Der Aufbau der Histondeacetylase 6 auf funktioneller Ebene nach Boyault et al.(45)

Die C-terminale Zinkfingerdomäne (ZnF-UBP) ermöglicht die Bindung von Ubiquitinmono- und -polymeren. Boyault et al. konnten 2006 zeigen, dass HDAC6 die höchste Affinität für Ubiquitinmonomere aller heute bekannten ubiquitinbindenden Proteine aufweist (46–48). Die ZnF-UBP sowie eine weitere dyneinmotorbindende Domäne (DMB), welche sich zwischen den beiden katalytischen Domänen befindet, stellen die wesentliche Voraussetzung für die Funktion von HDAC6 in der Autophagozytose dar. Nichtfunktionelle oder falsch gefaltete Proteine werden zunächst ubiquitinyliert. Werden diese ubiquitinylierten Proteine nicht sofort im Proteasom verarbeitet, aggregieren Sie und werden zytotoxisch. Über die ZNF-UBP Domäne vermag HDAC6 diese Proteinaggregate zu binden und stellt, durch Bindung an Dynein über die eigene DMB, das für den Transport der Proteine hin zum Aggresom, einem juxt nukleären, microtubuliabhängigen Einschlußkörper, notwendige Bindeglied dar. Aus einem bisher nicht eindeutig identifizierten Grund, ist für diese Funktion auch die katalytische Aktivität des Enzyms unabdingbar (49–51).

Diese katalytische Aktivität des Enzyms wird vermittelt durch seine zwei Deacetylasedomänen DD1 und DD2. HDAC6 ist die einzige Histondeacetylase, die über

zwei aktive Deacetylasedomänen verfügt (27). Ob beide Domänen für die volle Deacetylaseaktivität notwendig sind, ist nach wie vor umstritten. So wurden zunächst von Grozinger et al. gezeigt, dass jede Domäne unabhängig von der anderen katalytische Aktivität aufweist. Spätere Studien von Zhang et al. zeigten hingegen, dass beide Domänen notwendig sind und weitere Studien favorisieren den Standpunkt, dass nur die zweite Domäne essentiell für die katalytische Aktivität sei (27,52–54).

2002 wurde als erstes physiologisches HDAC6-Substrat α -Tubulin identifiziert (50,53,55). Der Acetylierungsstatus α -Tubulins spielt eine wesentliche Rolle für den intrazellulären Transport entlang der Microtubuli und dementsprechend kann auch der Transport von ubiquitinylierten Proteinaggregaten zum Aggresom oder der von Hubbert sowie Haggarty beschriebene Einfluss von HDAC6 auf die Zellmotilität erklärt werden (50,56–58).

Als weitere Substrate konnten neben Tubulin, Cortactin, β -Catenin, den antioxidativen Enzymen Peroxiredoxin I und II auch das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) identifiziert werden (34,59–62).

1.1.3.1 HSP90

HSP90 ist ein Stressprotein von außerordentlicher Bedeutung für die Regulation diverser Signalproteine, so auch für die Ausbildung der ligandenbindungsfähigen Konformation der Steroidrezeptoren. Das Chaperonprotein ist in allen eukaryotischen Zellen, zum überwiegenden Teil im Zytoplasma exprimiert und macht im ungestressten Zustand ca. 1-2% des Gesamtproteingehalts aus. HSP90 umschließt im Wesentlichen zwei Untereinheiten: zum einen den induzierbaren Subtyp HSP90 α sowie den konstitutiv exprimierten Subtyp HSP90 β , die eine Homologie von 86% aufweisen. Strukturell weisen diese Subtypen drei verschiedene Domänen auf. Aminoterminal findet sich die ATP-Bindungsdomäne (NBD), das mittlere Segment dient der Erkennung und Bindung der Chaperonklientel, wie z.B. Protoonkogenen oder

Steroidrezeptoren, und die Domäne am Carboxyterminus ist für die HSP90 Dimerisierung unverzichtbar (63–66). Zwischen ATP-Bindungsdomäne und dem mittleren Segment befindet sich ein Verbindungsstück, welches viele geladene Aminosäurereste aufweist (67). Diese Region wird auch als „charged linker“ bezeichnet und erwies sich als Segment des Proteins, welches der post-translationalen Modifizierung durch reversible Acetylierung unterliegt (68). Obwohl die Acetylase für HSP90 noch unbekannt ist, wurde mittels HDAC-Inhibitoren (69,70) und Mutationsstudien HDAC6 als eine Deacetylase für das Chaperon entdeckt und später aufgeklärt, dass die ausbleibende Deacetylierung an der Position K294 die Chaperonaktivität HSP90s einschränkt (34,62,71).

1.1.4 HDAC Inhibitoren

Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Vielzahl HDAC-inhibierender Verbindungen identifiziert und entwickelt, die meisten für den Einsatz gegen Tumorerkrankungen.

Alle entwickelten HDAC-Inhibitoren (HDACi) gleichen sich in der Funktion ihrer pharmakophoren Gruppen. Sie weisen eine zinkbindende Gruppe (ZBG) auf, welche das für HDACs relevante Zn^{2+} zu chelatisieren vermag. Die ZBG ist durch ein Verbindungsstück mit einem hydrophoben Rest (CAP) verbunden. Diese CAP-Gruppe dient der Erkennung von und Interaktion mit Proteinsubstraten und stellt somit den für die Substratspezifität bestimmenden Bestandteil dar (58,72,73).

Man kann diese Substanzen entsprechend der chemischen Struktur ihrer ZBG unterteilen in kurzkettige Fettsäuren, Hydroxamsäurederivate, Benzamide und cyclische Tetrapeptide (74)(Auswahl siehe Tabelle 2). All diesen Substanzen ist gemein, dass Sie kein HDAC spezifisch inhibieren. So inhibieren die kurzkettigen Fettsäuren die HDACs der Klassen I und IIa, die Hydroxamsäurederivate dagegen alle Klassen außer die Sirtuine/Klasse 3. Romidepsin zeigt unter den unspezifischen Inhibitoren noch die höchste Selektivität, da es nur HDAC1 und HDAC2 inhibiert (75).

Tabelle 2 Auswahl einiger in der klinischen Forschung entwickelter HDAC-Inhibitoren (HDACi) und Unterteilung in Klassen nach ihrer chemischen Struktur

HDACi Klasse	Vertreter
kurzkettige Fettsäuren	Butyrat
	Valproat
	Phenylbutyrat
	AN-9 (pivanex)
Hydroxamate	Vorinostat
	Belinostat
	Panobinostat (LBH589)
	Givinostat
	CUDC-101
	Resminostat
	SB939
Benzamide	Entoinostat
	Mocetinostat
	Chidamide
Cyclische Tetrapeptide	Romidepsin

Durch die mangelnde Selektivität ist es bisher nicht möglich zu differenzieren, welche tumorsupprimierenden Eigenschaften der Inhibition welcher HDACs zuzuschreiben ist, oder gar welcher Kombination. Da die tumorsupprimierenden Eigenschaften im Wesentlichen auf der vermehrten Transkription von Tumorsuppressorgenen durch Hyperacetylierung der Histone beruht, hier jedoch mangelnde Selektivität vorherrscht, ist so auch das erhebliche Nebenwirkungspotential dieser Substanzen zu erklären. In den letzten Jahren werden große Anstrengungen unternommen, selektive HDACi zu

entwickeln und somit auch das Nutzen-Risiko-Profil dieser pharmakologischen Wirkstoffklasse zu verbessern (58,74,76).

Trotz der zahlreichen Nebenwirkungen haben bereits zwei HDACi die FDA Zulassung erhalten. Zum einen Romidepsin (ISTODAX[®] von Celgene), ein Depsipeptid welches bereits 2009 als Arzneimittel gegen das kutane sowie das periphere T-Zell Lymphom zugelassen wurde und ein natürliches Produkt darstellt, gewonnen durch Fermentation aus dem Chromobacterium violaceum (siehe Abbildung 1.2). Romidepsin ist ein CYP3A4-Substrat und Prodrug. Nach Reduktion der Disulfidgruppe durch Glutathion entsteht eine Sulfhydrylgruppe, die ein ZBG darstellt und somit als HDACi wirken kann (77–81).

Das von der FDA bereits 2006 zugelassene Vorinostat (ZOLINZA[®] von Merck Sharp & Dohme Corp.) wird auch als SAHA (Suberoylanilid hydroxamic acid) bezeichnet und ist beim refraktären, fortgeschrittenen, kutanen T-Zell Lymphom indiziert. Im Gegensatz zu Romidepsin kann es peroral appliziert werden und gehört zur Gruppe der Hydroxamate. Es ist strukturell von Trichostatin A (TSA) abgewandelt und wurde 1996 synthetisiert, bevor 1998 die Charakterisierung als HDACi erfolgte (82,83).

TSA war das erste Naturprodukt, welches als HDACi identifiziert wurde (84). Ebenso wie Vorinostat wirkt es inhibierend auf HDACs im nanomolaren Bereich (85). Es ist ein Produkt von Streptomyces hygroscopicus und wurde ursprünglich aufgrund seiner 1976 identifizierten fungistatischen Eigenschaften als Antibiotikum eingesetzt (86). Für TSA wurde enantioselektive Funktionalität nachgewiesen; das (S)-Enantiomer ist inaktiv. Außerdem wurde gezeigt, dass der Austausch der Hydroxamatgruppe gegen eine Carboxylatgruppe ebenfalls zu Inaktivität hinsichtlich HDAC-Inhibition führt (87).

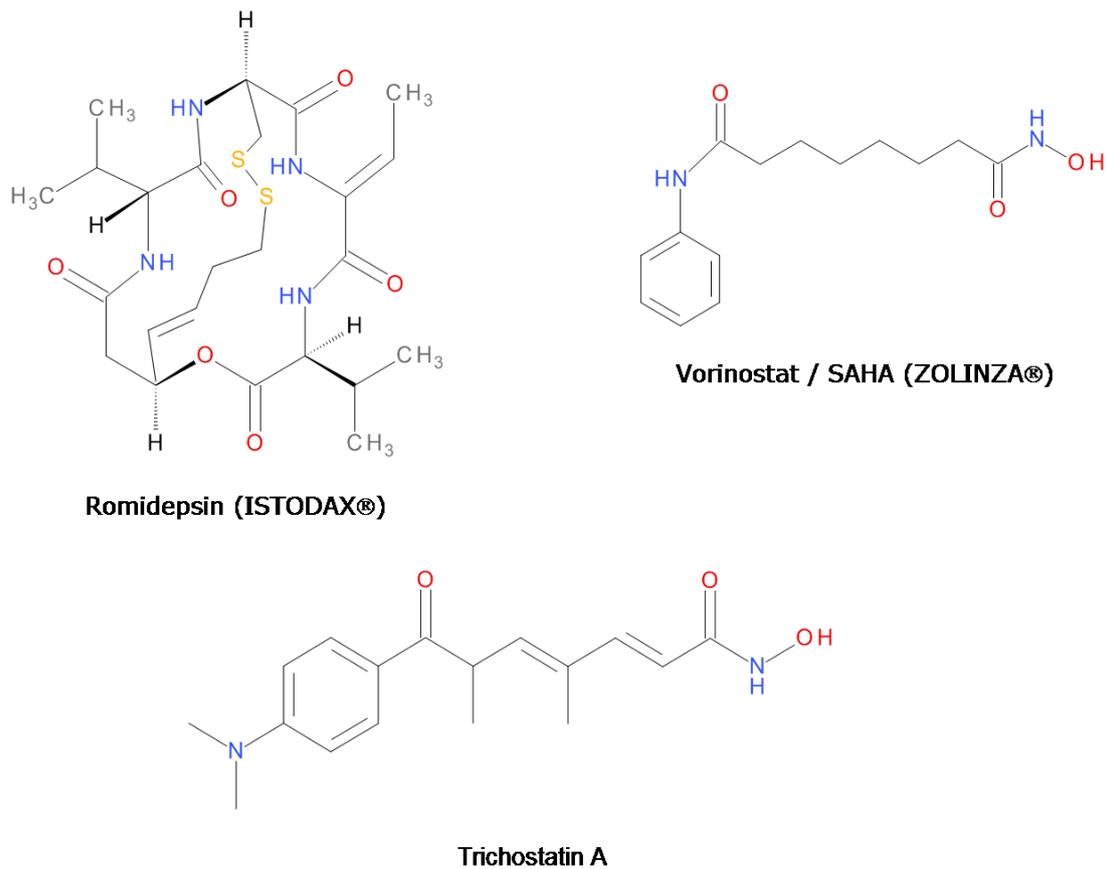


Abbildung 1.2 Strukturformeln der unselektiven HDAC-Inhibitoren Romidepsin, Trichostatin A und Vorinostat.

1.1.5 Tubacin als HDAC6 selektiver Inhibitor

Tubacin war im Jahr 2003 der erste selektive HDAC6 Inhibitor. Da HDAC6 bekanntermaßen α -Tubulin deacetyliert, wurde der Inhibitor nach dieser Funktion benannt: **Tubulin acetylation inductor**.

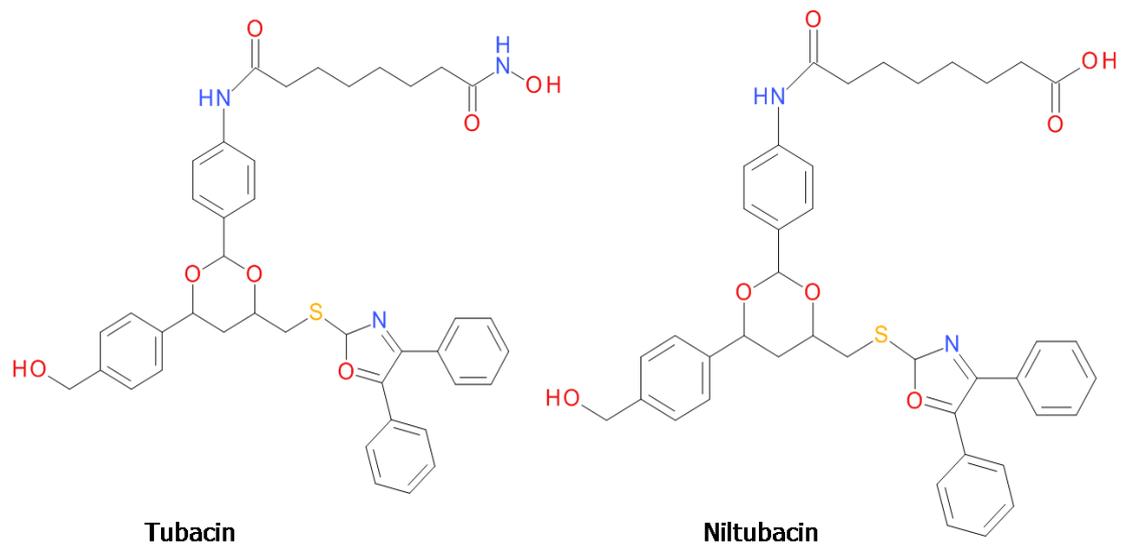


Abbildung 1.3 Strukturformel des selektiven HDAC6-Inhibitors Tubacin sowie seines Analogons Niltubacin, welches aufgrund der fehlenden Hydroxamsäurestruktur keine HDAC-inhibierende Wirkung aufweist.

Tubacin ist ein nicht-peptidisches Molekül, welches gut zellpermeabel ist, die HDAC6-vermittelte Tubulindeacetylaseaktivität inhibiert, eine für die inhibierende Wirkung verantwortliche Hydroxamsäuregruppe aufweist (siehe Abbildung 1.3). Das Molekül hat keinen Einfluss auf den Histonacetylierungsstatus. Es wurde initial gezeigt, dass Tubacin lediglich die C-terminale Deacetylasedomäne von HDAC6 inhibiert, welche für die Tubulindeacetylierung verantwortlich ist (27,58). In einer späteren Arbeit wurde außerdem bestätigt, dass Tubacinstimulation in Zellkulturexperimenten durch HDAC6-Inhibition zu HSP90 Hyperacetylierung führt (88).

Seit kurzem ist mit Tubastatin A ein weiterer selektiver HDAC6-Inhibitor zu erwerben (76).

1.2 Glucocorticoide

1.2.1 *Endogene Glucocorticoide*

Im Menschen ist Cortisol der Hauptvertreter der Glucocorticoide, welche zu den Corticosteroiden, einer Gruppe von in der Nebennierenrinde gebildeten Steroidhormonen gezählt werden. Es entsteht in der Zona fasciculata, stimuliert durch das hypophysäre adrenocorticotrope Hormon (ACTH) aus dem Ausgangsstoff Cholesterin. Die Freisetzung des ACTHs wiederum wird durch das hypothalamische Freisetzungshormon (CRH) reguliert, welches ein wichtiger Bestandteil der Stressantwort ist (89).

Das Grundgerüst des Cortisols, wie auch aller anderen Corticosteroide ist das Progesteron. Cortisol wird in seiner synthetischen Form als Hydrocortison bezeichnet, weil es sich von Cortison nur in der Hydroxy- statt Ketogruppe am C-11 unterscheidet. Dabei macht das Cortisol (siehe Abbildung 1.4) ca. 95% der Gesamtglucocorticoidkonzentration im Menschen aus und das Cortison nur ca. 5% (90,91). Im Gegensatz zum Menschen stellt im Nager Corticosteron (siehe Abbildung 1.4) das hauptsächlich zirkulierende Glucocorticoid dar (92).

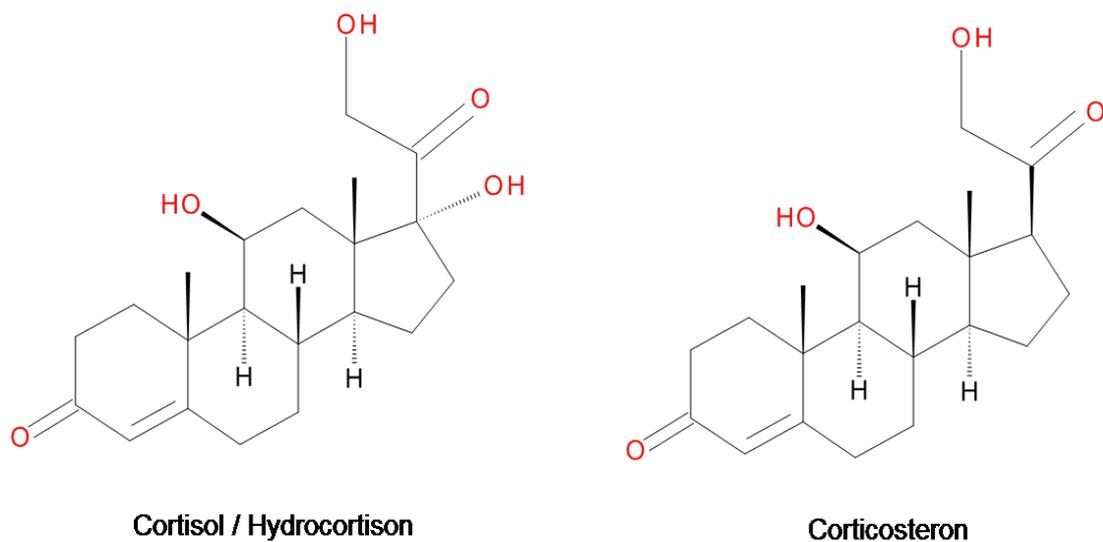


Abbildung 1.4 Strukturformeln der aktiven endogenen Glucocorticoide in Mensch und Nager

Im Blut liegt Cortisol zu 90% an Plasmaproteine gebunden vor, wovon 75% an Transcortin, ein spezifisches corticoidbindendes Globulin, und 15% an Albumin gebunden sind (93,94).

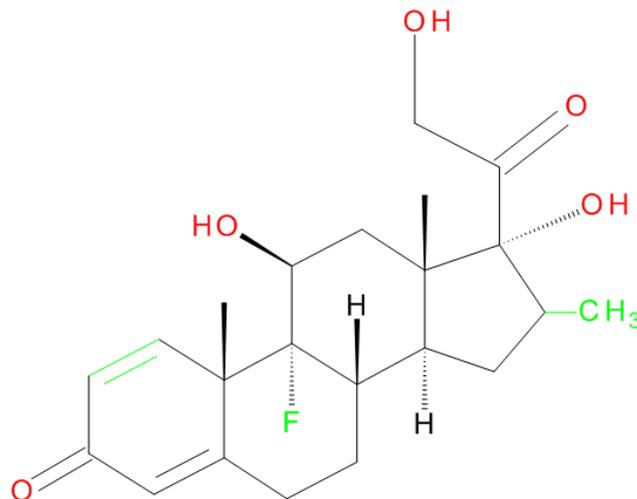
Cortisol wird in einem circadianen Rhythmus sezerniert mit einem Maximum am Morgen und einem Minimum gegen Mitternacht. Für die Regulation der Freisetzung ist eine intakte Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HHNR)-Achse notwendig um die ständige Adaption an Umwelteinflüsse zu gewährleisten (95,96). Die Cortisolfreisetzung unterliegt einem negativen Feedbackmechanismus, der nicht nur durch endogene, sondern auch durch exogen zugeführte Glucocorticoide beeinflussbar ist. Die Folge vermehrter Inhibition der HHNR-Achse ist u.a. eine verminderte Fähigkeit auf Stresssituationen zu reagieren (97).

1.2.2 Exogene Glucocorticoide

Corticosteroide ist der generell gebräuchliche Begriff für exogene Glucocorticoide. Die heute verwendeten Corticosteroide sind ausgehend vom Cortisol (siehe Abbildung 1.4) synthetisiert worden und stellen alle Pregnanderivate dar.

Der wesentliche Unterschied der Corticosteroide zu ihren endogenen Pendanten besteht darin, dass sich aufgrund struktureller Veränderungen das Verhältnis von mineralocorticoidartiger zu glucocorticoidartiger Wirkung beeinflussen lässt. So zeigt Fludrocortison beispielsweise eine mehr als hundertfach stärkere mineralocorticoidale Potenz als Cortisol und Dexamethason eine 30-fach stärkere glucocorticoidale bei einer gegen null tendierenden mineralocorticoiden Potenz (siehe Abbildung 1.5). Trotz etlicher struktureller Veränderungen der Corticosteroide ist es bisher nicht gelungen sogenannte selektive Glucocorticoidrezeptoragonisten (SEGRA) zu entwickeln, von denen man sich verspricht die erwünschten von den, nicht unerheblichen, unerwünschten Wirkungen der Glucocorticoide trennen zu können. Es ist zwar gelungen, die Potenz gegenüber Cortisol deutlich zu erhöhen, das Wirkspektrum bleibt jedoch gleich. In Anbetracht der Tatsache, dass es 2009 in Deutschland über 8 Millionen Verordnungen von systemisch angewandten Corticosteroiden gab besteht also immer noch Forschungsbedarf zur Verbesserung des Nutzen-Risiko-Profiles dieser Arzneistoffgruppe (90,98,99).

Die wesentlichen Einsatzgebiete der Corticosteroide stellen die Substitutionstherapie bei primärer Nebenniereninsuffizienz, die Hemm- oder Suppressionstherapie, rheumatoide Arthritis, obstruktive Lungenerkrankung, allergisch bedingte Hauterkrankungen oder die Gabe nach Organtransplantationen dar (100).



Dexamethason

Abbildung 1.5 Strukturformel des Glucocorticoids Dexamethason

Die strukturellen Unterschiede zu Cortisol sind grün gekennzeichnet. Diese Unterschiede, insbesondere die Methylierung am C-16 beeinflussen die glucocorticoid- und mineralocorticoidartige Wirkung. Durch die strukturellen Unterschiede hat Dexamethason im Gegensatz zu Cortisol keinerlei mineralocorticoidartige Wirkungen, dafür eine 30-fach stärkere Glucocorticoidwirkung (gemessen an der entzündungshemmenden Wirkung). Desweiteren liegt Dexamethason im Blut nicht an CBG, sondern an Albumin gebunden vor.

1.2.3 Der Glucocorticoidrezeptor – Struktur, Ligandeninteraktion, Wirkung

Der Glucocorticoidrezeptor (GR) ist ein aus 777 Aminosäuren bestehendes Protein, welches in drei funktionelle Domänen unterteilt wird. Die aminoterminal Region wird als A/B oder immunogene Domäne bezeichnet und weist antigene Eigenschaften auf. Die Mittlere Domäne ist die DNA-bindende Domäne und carboxyterminal ist die corticoidbindende Domäne angesiedelt, welche als Interaktionenschnittstelle nicht nur für Glucocorticoide, sondern auch HSP90 fungiert und bedeutend ist für die nukleäre Translokation sowie die Dimerisierung und Transaktivierung (101).

Es existieren diverse Splicingvarianten des GR, die teilweise gewebespezifisch exprimiert werden und zelltypspezifische Effekte durch Glucocorticoidbindung vermitteln (102). Die zwei wesentlichen Subtypen des GR sind die α - und die β -Form. Dabei ist GR α der Subtyp, der Glucocorticoide binden kann und GR β eine alternative Splicingform des GR, die zwar mit der DNA interagiert, jedoch nicht mit Glucocorticoiden. Daher könnte diese Splicingvariante als ein negativer Inhibitor auf glucocorticoidvermittelte Effekte wirken, indem die Bindung des aktivierten GR α an die DNA behindert wird (103).

Der GR, auch bezeichnet als NR3C1, gehört zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Hinsichtlich der Nomenklatur steht NR für Nukleäre Rezeptoren, 3 für die Unterfamilie, C für die Gruppe und 1 für den Subtyp der Gruppe. In derselben Gruppe finden sich der Mineralcorticoidrezeptor, sowie der Progesteron- und der Androgenrezeptor (104).

Auf molekularer Ebene diffundieren Glucocorticoide, als exogene Liganden des GR, aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften leicht durch die Zellmembran und binden an den zytoplasmatisch lokalisierten Glucocorticoidrezeptor, der sich um hohe Ligandenbindungsfähigkeit zu erlangen in einem Chaperonkomplex befindet. Nach Bindung des Liganden transloziert der Ligand-Rezeptor-Komplex vom Chaperon ab und in den Zellkern (105,106). Diverse Studien haben mittlerweile gezeigt, dass die Translokation in den Zellkern innerhalb von 20-30 Minuten erfolgt (107,108).

Bevor Ligand gebunden wird, ist der GR im Cytoplasma lokalisiert und befindet sich dort in einem Chaperonkomplex mit zwei Molekülen HSP90 und diversen Cochaperonen, wie HSP70, p23 und Hop (109–111). Durch die Ausbildung dieses Komplexes wird die Bindung zwischen GR und Glucocorticoid maßgeblich beeinflusst, denn der Chaperonkomplex fördert die Reifung des GR und bewerkstelligt die Ausbildung einer ligandenbindungsfähigen Konformation des Rezeptors indem die Bindungstasche geöffnet wird. Die Affinität des GR gegenüber dem Liganden sinkt bei ausbleibender Interaktion mit dem Chaperonkomplex um den Faktor 100. Des

Weiteren werden die „nuclear localization signals“ (NLS) des GR durch HSP90 maskiert, weshalb dieser im Zytoplasma verweilt (112–114). Nach Bindung des Liganden dissoziiert der GR von den HSP90-Molekülen ab und wird durch die damit wiederhergestellte Zugänglichkeit der NLS zur Translokation in den Zellkern mit Hilfe von Importin- α und Importin- β befähigt (108,115,116).

Der GR kann vor der Translokation in den Zellkern dimerisieren und nukleär an korrespondierende Promotorregionen in Zielgenen binden und die Expression dieser Gene induzieren. Dies wird generell als Transaktivierung bezeichnet. Des Weiteren kann er als Monomer sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär mit anderen Transkriptionsfaktoren bzw. Proteinen interagieren um seine biologische Antwort zu vermitteln, was im Allgemeinen als Transrepression bezeichnet wird, da es zur Repression der Transkription kommt. Die Zahl der GR-regulierten Gene in Zellen liegt im dreistelligen Bereich. Für detailliertere Ausführungen sei auf die Publikationen (108,117–122) sowie das Buch (91) verwiesen.

Die für die Transaktivierung relevanten Promotorregionen der Zielgene werden als GRE, für Glucocorticoid Response Element, bezeichnet (123). Mitunter treten die GRE in Clustern auf und werden dann als glucocorticoid responsive units (GRU) bezeichnet. Für viele GR Zielgene hat sich gezeigt, dass wenn eine GRU in der Promotorregion vorliegt, die Aktivierung dieser durch Corticoide eine vielfach stärkere Genexpressionsinduktion mit sich bringt, als die Aktivierung einfacher GRE (124–126). Als weiterer Mechanismus der Transaktivierung, obwohl nicht direkt über GRE vermittelt, gilt die Funktion als Ko-Faktor. Der GR wird dabei zu DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren in einen regulatorischen Komplex rekrutiert. Dabei können die letztendlichen Effekte induzierender als auch reprimierender Natur sein. Als Beispiel sei hier die Interaktion mit Stat5-Proteinen zur verstärkten Aktivierung des β -Caseingens genannt (127).

Die Aktivierung der Transkription nach Bindung des GR an die DNA erfolgt entweder über das Chromatinremodelling, wie es z.B. beim Maus-Mammatumovirusgens (MMTV) der Fall ist oder über die Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie, wie z.B. dem Transkriptionsfaktor IID (128,129).

Die Transrepression erfolgt entweder durch direkte Inhibition der Genexpression über negative GRE (nGRE), durch kompetitive Bindung und somit Antagonisierung anderer Transkriptionsfaktoren wie z.B. HNF4, oder durch Protein-Protein-Interaktionen.

Die Bindung an nGRE kann die Genexpression ebenso direkt inhibieren sowie negativ regulieren, wie die Bindung an GRE eine positive Regulation bewirkt. Außerdem spielt bei der direkten Inhibition ein weiterer Mechanismus eine Rolle: Nach Bindung an nGRE ist für bestimmte Gene, wie z.B. das CRH-Gen die Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren oder Ko-Aktivatoren, wie in diesem Fall Activator Protein 1 (AP-1) erforderlich (130).

Für die anti-inflammatorischen Effekte der Glucocorticoide konnte bisher kein nGRE identifiziert werden. Außerdem zeigen diverse Studien, dass der repressive Effekt der Glucocorticoide DNA-unabhängig ist (131–134). Die Arbeit von Reichardt et al. zeigt dabei eindrucksvoll, wie eine GR-Punktmutation die Dimerisierung des Rezeptors unterbindet und dennoch, obwohl das DNA-Bindungsvermögen nach Dimerisierung fehlt, die anti-inflammatorischen Eigenschaften der Glucocorticoide erhalten bleiben. Inflammatorisch bedeutsame Gene werden in ihrer Expression durch Glucocorticoide beeinflusst, indem der GR nach Ligandenbindung mit für diese Gene relevanten Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) oder AP-1 interagiert. Es ist nicht endgültig gesichert, in welchem Kontext welche Interaktion für die anti-inflammatorischen Eigenschaften verantwortlich ist, jedoch existieren mehrere Mechanismen, über die der GR seine Wirkung entfaltet. Zum einen wird das kompetitive Modell erforscht, welches besagt, dass die interagierenden Proteine GR und AP-1 sowie GR und NF- κ B um ihre jeweiligen responsiven Elemente auf der DNA

konkurrieren (135). Es wurde darüber hinaus die Assoziation der p65 Untereinheit von NF- κ B und dem GR nachgewiesen welche einen funktionellen Antagonismus nach sich zieht und in der Inhibition der NF- κ B-Transaktivierung resultiert (122). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die GR-vermittelte Induktion von I- κ B via PKAc zur verminderten Aktivität von NF- κ B führt (136,137). Die Beteiligung des CREB-bindenden Proteins (CBP) ist bisher nicht eindeutig belegt (138,139).

1.2.4 Erwünschte und unerwünschte Wirkungen

Die systemische Glucocorticoidtherapie wird im klinischen Alltag häufig verwendet – in einer 1996 publizierten Studie wurde gezeigt, dass bei rund 0.5% der Gesamtpopulation und bei 1.7% der über 55-jährigen Frauen Glucocorticoide eingesetzt werden (140). Hierbei fallen zwei Drittel der Indikationen auf die rheumatoide Arthritis, die Polymyalgia rheumatica und obstruktive Lungenerkrankungen.

Auf molekularer Ebene führt die Glucocorticoidbehandlung zu einer Genrepression diverser inflammatorischer Zytokine wie Interleukin 1 β , Interleukin 6, TNF- α , verschiedener Chemokine oder des Peptids Endothelin aber auch der inflammatorischen Enzyme COX2 und der Phospholipase A2, wodurch wiederum die Bildung von Arachidonsäure vermindert wird (117). Durch diese und etliche andere Regulationen wird die potente anti-inflammatorische sowie immunsuppressive Wirkung der Glucocorticoide erklärt.

Dem Einsatz der Glucocorticoide, insbesondere hochdosiert angewendet, steht eine Reihe ausgeprägter unerwünschter Arzneimittelwirkungen gegenüber. Patienten, die mit Glucocorticoiden behandelt werden haben ein signifikant erhöhtes Risiko Bluthochdruck, Osteoporose oder eine Hyperglykämie, die sich zu einem Diabetes Mellitus Typ 2 ausweiten kann, zu entwickeln. Die Hyperglykämie wird hauptsächlich einer verstärkten Gluconeogenese und der Entwicklung einer peripheren Insulinresistenz, speziell der Leber, des Fettgewebes und Skelettmuskels zugeschrieben.

Bis zu 25% aller mit einer Hochdosis Glucocorticoid-behandelter Patienten erkranken sogar an einem anhaltenden Steroiddiabetes, der das Absetzen der Glucocorticoide und/oder den Beginn einer anti-diabetischen Therapie nötig macht (141–147).

Die GR-vermittelte Störung des Insulin- und Glucosestoffwechsels, die letztendlich in einem Steroiddiabetes münden kann, ist nach derzeitigem Wissen auf die Wirkung der Glucocorticoide auf Pankreas, Fettgewebe, Skelettmuskel und Leber zurückzuführen (148,149).

Für den Pankreas ist bis dato nicht eindeutig geklärt, ob Glucocorticoide zu einer gesteigerten oder supprimierten Insulinproduktion führen, jedoch wurde belegt, dass GR-Überexpression in β -Zellen bei Mäusen im Alter von 12-15 Monaten zu einem manifesten Diabetes führt (150–153).

Im Fettgewebe führen Glucocorticoide zu einer Beeinträchtigung der Insulinsignalkaskade, indem die Insulinrezeptorsubstrate 1 und 2 (IRS1 und IRS2) schwächer exprimiert werden (154). Außerdem sind Aktivität der Phosphoinositol-3-kinase (PI3K) sowie die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) eingeschränkt (155,156). Diese Einflüsse schlagen sich entsprechend in verminderter Glucoseaufnahme durch den Glucosetransporter 4 (GLUT4) nieder, dessen Translokation zur Plasmamembran inhibiert ist (157). Da GLUT4-Mangel im Fettgewebe zu Glucoseintoleranz und Insulinresistenz in Mäusen führt, ist die Wirkung der Glucocorticoide auf das Fettgewebe in Hinblick auf die Entwicklung des Steroiddiabetes von Bedeutung (158).

Der Effekt der Glucocorticoide auf den Skelettmuskel korreliert in Hinblick auf die Entstehung des Steroiddiabetes mit dem Fettgewebe. Der Skelettmuskel stellt das wesentliche Organ bezüglich der Glucoseaufnahme dar. Circa 70-80% der Gesamtglucose werden aus der Blutbahn in den Skelettmuskel aufgenommen (159). Glucocorticoide führen auf molekularer Ebene im Skelettmuskel zur Reduktion der

Insulinrezeptorphosphorylierung sowie der PI3K Aktivität (160,161). Zusätzlich ist die insulinstimulierte Akt-Phosphorylierung vermindert (162). Diese Effekte resultieren in verminderter GLUT4-Translokation zur Plasmamembran, folglich beeinträchtigter Glucoseaufnahme in die Muskelzelle und letztendlich zur Insulinresistenz (163,164).

Die Glucocorticoide verdanken ihren Namen der Tatsache, dass sie einen wesentlichen Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel haben. Dies wird primär vermittelt durch die Regulation der Gene, die in der Leber spezifisch für die Gluconeogenese sind. Dies sind die Glucose 6-Phosphatase (G6P), Fructose 1,6-Bisphosphatase (FBP), Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und die Pyruvatcarboxylase (PCX) (siehe Abbildung 1.6)(149,157,165,166).

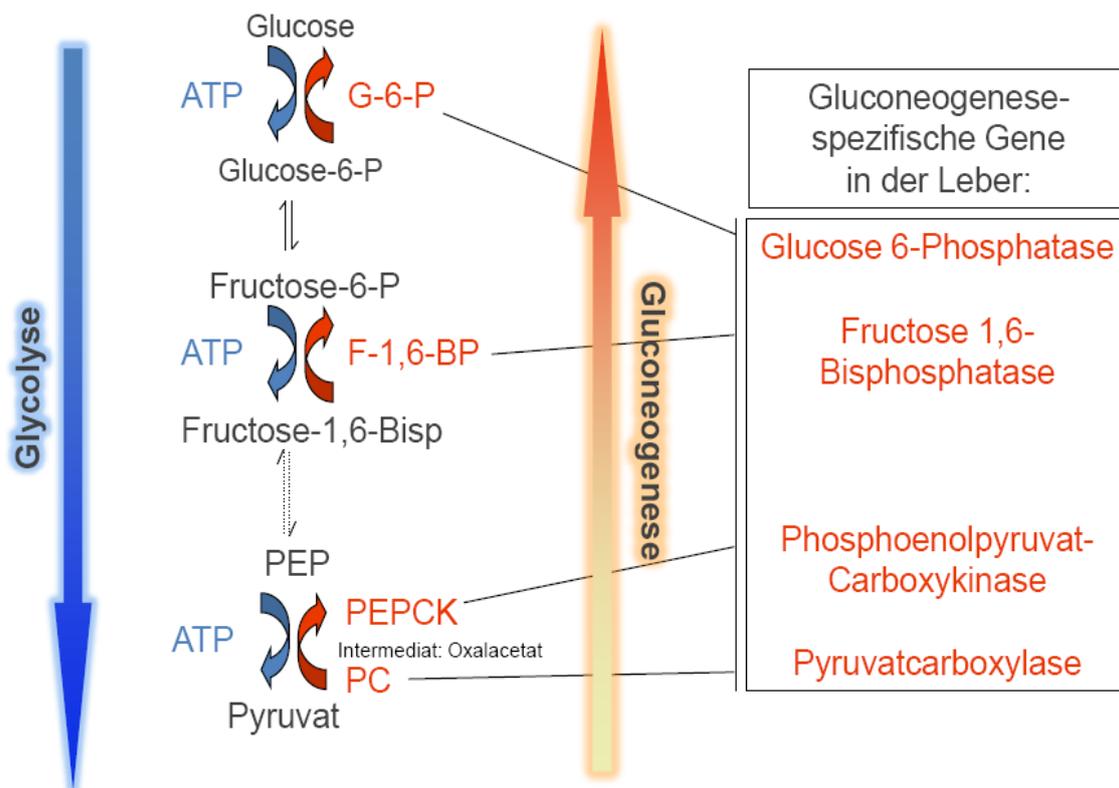


Abbildung 1.6 Vereinfachte Darstellung der Gluconeogenese die keine direkte Umkehrung der Glycolyse darstellt, da bestimmte Schritte der Glycolyse irreversibel sind. In der Gluconeogenese sind daher zur energetisch aufwendigen Umwandlung des Ausgangsproduktes Pyruvat bzw. den vorhergegangenen Aminosäuren hin zum Endprodukt Glucose vier energieverbrauchende Schritte notwendig, die durch die oben angegebenen Enzyme katalysiert werden.

Durch die Gluconeogenese wird während Fastenperioden sichergestellt, dass extrahepatisches Gewebe, wie das Gehirn oder Erythrozyten, durch die Bereitstellung von Glucose, mit dieser als notwendigem Energiesubstrat versorgt werden können. Die Schattenseite der Gluconeogenese tritt jedoch im unkontrollierten Zustand zu Tage. Bei Typ 2 Diabetikern oder auch durch chronische Corticoidgabe leistet die hepatische Gluconeogenese einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung einer Hyperglykämie (167).

Die Entstehung der Hyperglykämie und der folgenden Glucoseintoleranz sowie Insulinresistenz wird also durch die diversen Effekte im Pankreas, des Fettgewebes, dem Skelettmuskel und der Leber verursacht. Dabei ist zu beachten, dass nicht nur die Effekte auf die Glucoseproduktion bzw. die Glucoseaufnahme und die Insulinsekretion bei der Entstehung eine Rolle spielen, sondern auch der Einfluss der Glucocorticoide auf den Fett- und Proteinstoffwechsel (168,169). Die Glucocorticoide führen unter anderem im Fettgewebe zur gesteigerten Lipolyse sowie vermehrten Freisetzung freier Fettsäuren durch die Induktion der Hormon-sensitiven Lipase und Reduktion der Lipoproteinlipase (170). Im Skelettmuskel hingegen kann bei Corticoidgabe Muskelatrophie und gesteigerte Freisetzung von Aminosäuren beobachtet werden (146). Es werden somit zwar Substrate für die Gluconeogenese und andere biochemische Prozesse bereitgestellt jedoch auch eine Fettumverteilung verursacht und es kann zur Ausbildung einer Fettleber kommen, welche wiederum zur hepatischen Insulinresistenz und weiter gesteigerten hepatischen Glucoseproduktion führt. Die Ausbildung der Fettleber und damit Beeinträchtigung der hepatischen Insulinsignalkaskade wird begünstigt durch die durch Corticoide verursachte gesteigerte Triglyceridsynthese, verminderte Fettsäureoxidation und der daraus resultierende Lipidanreicherung in der Leber (171–173).

In den 90er Jahren wurden bei einer mit knapp 12000 Glucocorticoid-behandelten Patienten angelegten Studie in den USA untersucht, ob sie in den ersten vier Monaten nach Therapiebeginn mit oralen Antidiabetika behandelt werden mussten, um den

Blutzucker auf ein normales Niveau einzustellen. Dabei stellte sich heraus, dass das relative Risiko verglichen mit einer nicht-Corticoid-behandelten Kontrollgruppe an einem Diabetes Mellitus zu erkranken bei niedriger Corticoidmenge bei 1,8 und bei hoher Corticoidmenge bei über 10 lag (142). Daher werden Optionen, das Nutzen-Risiko-Profil der Glucocorticoide zu verbessern dringend benötigt.

1.3 Zusammenhang HDAC6 und GR via HSP90

Seit längerem ist bekannt, dass HSP90 für die Reifung und somit zur Ausbildung der ligandenbindungsfähigen Konformation des GR unbedingt notwendig ist (110). Verschiedene Gruppen haben bereits gezeigt, dass eine Störung der Interaktion zwischen Chaperonproteinen und GR, wie z.B. durch den HSP90 Inhibitor Geldanamycin zu einer vielfach verminderten Ligandenbindungsaffinität des Rezeptors führen und entsprechend mit eingeschränkter corticosteroidinduzierter Translokation und verringerter transkriptioneller Aktivität einhergehen (174–176) (siehe Abbildung 1.7).

Ein wichtiger Faktor, der die Interaktion zwischen HSP90 und dem GR in dieser Hinsicht beeinflusst ist der Acetylierungsstatus von HSP90. Dieser ist maßgebend für die ATP-Bindungsfähigkeit des Chaperons und damit auch für die Bindungsfähigkeit seiner Klientelproteine und Cochaperone (71,112,177). In diesem Zusammenhang wurde der HDAC6 in letzter Zeit sehr viel Aufmerksamkeit zuteil, da diese als wesentliche HSP90 Deacetylase identifiziert wurde. HDAC6 Inhibition führt zu Hyperacetylierung von HSP90 und verhindert die Deacetylierung des Chaperons. Da die Deacetylierung von HSP90 insbesondere an K294 eine Voraussetzung zur Ausbildung des GR-HSP90-Komplexes ist, führt die Blockade oder Ablation von HDAC6 zu beeinträchtigter chaperonabhängiger Aktivierung des GR. In vitro ist die Ligandenbindung des GR resultierend um das 5-6-fache reduziert, die

corticosteroidinduzierte nukleäre Translokation in den Nukleus sowie die GR-induzierte Genregulation blockiert (34,62,71).

Zhang et al. konnten in embryonalen Fibroblasten HDAC6-defizienter Mäuse (MEFs) ebenfalls hyperacetyliertes HSP90, eine eingeschränkte dexamethasoninduzierte Translokation des GR in den Nukleus und eine um ein Drittel verminderte transkriptionelle Aktivität des GR nachweisen (178).

Zusammenfassend scheint HDAC6 ein neuer molekularer Modulator der HSP90-GR Interaktion und somit der GR induzierten Effekte zu sein. In Hinblick auf die pharmakologische Bewandnis stellen HDAC6-Inhibitoren, wie das von Stuart Schreiber und Kollegen entwickelte Tubacin eine vielversprechende Möglichkeit dar, die unerwünschten Wirkungen der Corticosteroide zu unterbinden (58).

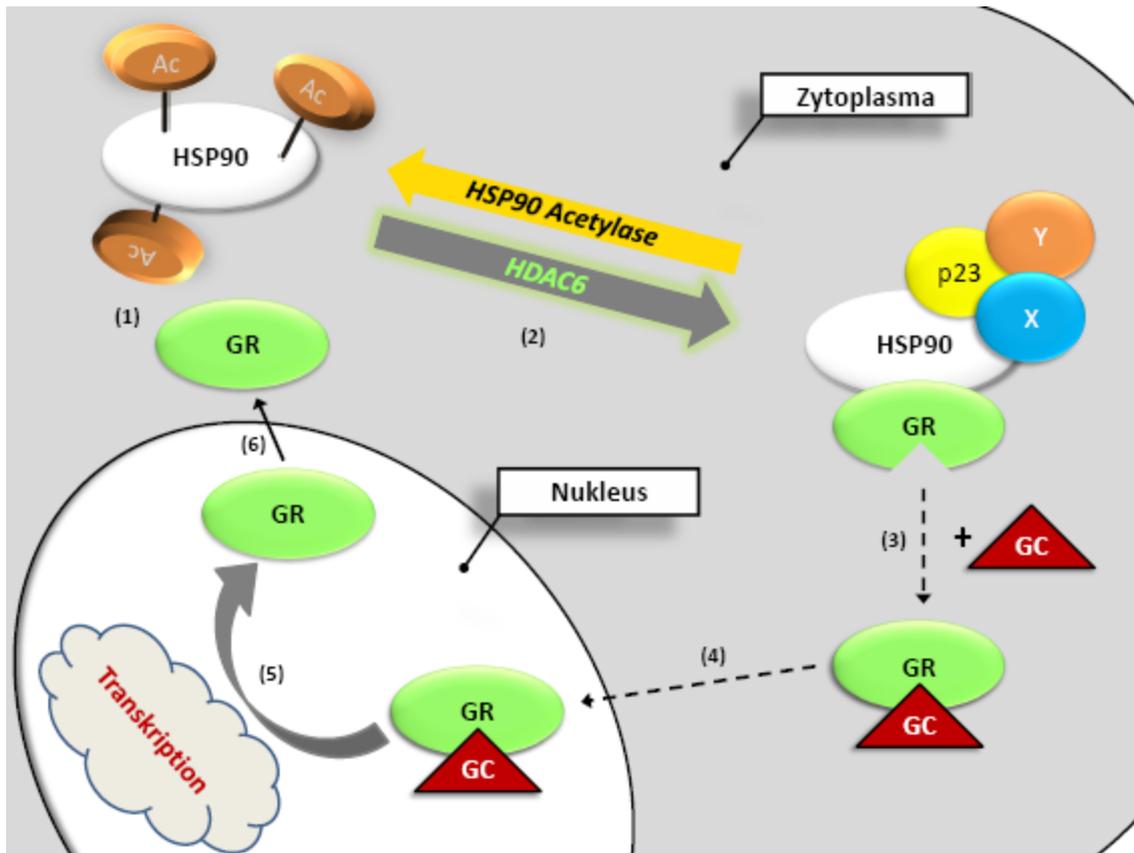


Abbildung 1.7 Vereinfachtes Schema der derzeitigen Vorstellung des HDAC6-Einflusses auf die GR-Translokation und -Funktion (nach Kovacs et al. (179))

Der GR liegt im inaktiven Zustand im Zytosol neben acetyliertem HSP90 vor (1). Die HDAC6 vermittelte Deacetylierung des HSP90 kann zur Rekrutierung verschiedener Co-Chaperone (p23, X, Y, siehe unten) zum HSP90 führen (2), wodurch die Ausbildung eines Komplexes mit dem GR begünstigt wird. In diesem Komplex wird der GR so gefaltet, dass er seine ligandenbindungsfähige Konformation erlangt. Er wird somit in die Lage versetzt Liganden mit hoher Affinität zu binden (3) und anschließend in den Nucleus zu translozieren (4). HSP90 wird nach Ligandenbindung und Dissoziation des GR von einer noch unbekanntem Acetylase re-acetyliert und die Co-Chaperone abgespalten. Als Mono- oder Homodimer, reguliert der GR im Nucleus die Transkription diverser Gene durch die Bindung an positive oder negative Glucocorticoid Response Elements (GRE und nGRE) auf der DNA bzw. durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (5). Anschließend dissoziiert der Ligand vom GR, dieser erlangt wiederum seine inaktive, nicht-ligandenbindungsfähige Konformation und transloziert zurück ins Zytoplasma (6). HDAC6 Defizienz bzw. Inaktivierung kann somit zu die Ausbildung des HSP90-GR-Komplexes und somit die sich anschließenden Schritte unterbinden. X und Y stellen symbolisch weitere Co-Chaperone wie z.B. HSP70, HSP40 oder Hop dar.

1.4 Zielstellung

Bis heute beschränken sich die wissenschaftlichen Veröffentlichungen hinsichtlich der Rolle von HDAC6 für die GR-Funktion auf in vitro und einige wenige ex vivo Experimente. Eine weitergehende Erforschung dieser Experimente in vivo ist daher erforderlich. Die Arbeitsgruppe von Patrick Matthias am Friedrich-Miescher-Institut in Basel hat das notwendige Werkzeug für diese Aufgabe erzeugt, indem sie eine HDAC6 Knockout Maus auf C57Bl/6 Hintergrund gezüchtet hat. Diese Mäuse sind lebensfähig, fortpflanzungsfähig und weisen erstaunlicherweise einen nur sehr milden Phänotyp mit leichter Beeinflussung der Immunantwort sowie eine leicht erhöhte Spongiosaknochenmineraldichte auf. Auf molekularer Ebene weisen die Tiere eine deutliche Tubulin- und HSP90-Hyperacetylierung auf, die mit beeinträchtigter HSP90 Funktion korreliert (178).

Kovacs und Kollegen konnten eindrucksvoll zeigen, dass die HSP90-Aktivität durch reversible Acetylierung reguliert wird, die wiederum von HDAC6 kontrolliert wird. Beeinträchtigte Faltung des GR, verminderte Ligandenbindung und eingeschränkte nukleäre Translokation sowie abgeschwächte transkriptionelle Aktivierung waren die Ergebnisse der Experimente (34).

In einer 2003 veröffentlichten Arbeit von Bernal-Mizrachi et al. wurde beschrieben, wie eine über drei Wochen angelegte Dexamethasonbehandlung von C57Bl/6-Mäusen zur Entwicklung eines Steroiddiabetes, gekennzeichnet durch eine markanten Hyperglykämie, Insulinresistenz und Glucoseintoleranz führt (141).

Diese Veröffentlichungen und das Wissen um die erheblichen unerwünschten Wirkungen einer Corticosteroidtherapie bildeten den wesentlichen Grundstein für die generierte Hypothese, die dieser Arbeit und den durchgeführten Experimenten zugrunde liegt. Diese Arbeit befasst sich entsprechend mit der Erforschung und Etablierung der Rolle von HDAC6 im GR-vermittelten Glucosstoffwechsel in vivo und

der Bedeutung für die Entwicklung einer Corticosteroid-induzierten Hyperglykämie und Insulinresistenz. Weitergehend sollte untersucht werden, ob und wie HDAC6 Defizienz bzw. die pharmakologische Inhibition des Enzyms zu einer Unterbindung der Entwicklung eines Steroiddiabetes führen kann.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 *Material*

2.1.1 *Laborgeräte*

BioHit Proline elektrische Pipetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Blotkammer und Apparatur	BioRad GmbH, München, D
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, D
CO ₂ -Inkubator HeraCell 150	Heraeus, Hanau, D
Curix 60 Entwicklungsmaschine	AGFA, Köln, D
ebq 100 isolated	Leistungselektronik Jena GmbH, Jena, D
EC 350-1 und -2 Einbettgerät	Microm, Walldorf, D
HM325 Microtom	Microm, Walldorf, D
Ikamag RCT Heizplatte/Magnetrührer	Th. Karow GmbH, Berlin, D
LabMaster Stoffwechsellkäfige	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, D
Laminar-Flow-Arbeitsbank LaminAir 1.2	Heto-Holten, Allerød, DK
Leica CTRMIC	Leica Camera AG, Solms, D
Leica DM LB2	Leica Camera AG, Solms, D
Leica DMIRE2 Fluoreszenzmikroskop	Leica Camera AG, Solms, D
Leica EG1130	Leica Camera AG, Solms, D
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Megapixel Firewire Camera	PixLINK, Ottawa, CAN
Mikro 20 und 22R Zentrifuge	Hettich, Hanau, D
Mikroskop Olympus CK 40	Olympus, Hamburg, D
pH-Meter pH211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, D
Pipetten 0,5 - 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Power Pac 300	BioRad GmbH, München, D

Promax 1020 Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, D
PTC-100 Programmable Thermal Controller	MJ Research Inc., Waltham, USA
Retiga 1300	Qimaging, Surrey, CAN
Rota-Filler 3000	Heathrow Scientific, Nottingham, UK
rt-PCR Mx3000P	Stratagene, Amsterdam, NL
Safelight Alu XO	PEHA Med. Geräte GmbH, Sulzbach, D
Shandon Citadel 1000	Thermo Electron, Piräus, GR
Tempcontrol 37-2 digital	Leica Camera AG, Solms, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge Galaxy Mini	Merck Eurolab, Darmstadt, D
Typ MRL 280, Electrolux Medical Refrigerator	Morton Medical Ltd. Cirencester, UK
Unitron Inkubationsschüttler	INFORS, Basel, CH
Verbrauchsartikel (z.B. Falcons, Pipetten, Spitzen)	BD, Sarstedt, Nümbrecht oder VWR
Vortex Genie 2, Scientific Industries	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Waage BL 1500S	Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, D
Wheaton Dounce Tissue Grinder	VWR International GmbH, Darmstadt, D

2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Acrylamid/Bis (30%)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Bromphenolblau	VWR, Darmstadt, D
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
Coomassie	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
desoxy-dinukleotiddiphosphate (dNTP)	Promega, Mannheim, D

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Eosin	Waldeck GmbH, Münster, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
GeneRuler 100bp DNA	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Glycerol	VWR, Darmstadt, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Hämatoxyllin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver, Blotting Grade	Roth, Karlsruhe, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, D
M-MLV RT 5x Buffer	Promega, Mannheim, D
N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
NeoClear	Merck, Darmstadt, D
Nonidet P-40 substitute (NP-40)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Orange G	Merck, Darmstadt, D
Paraffin I	Microm, Walldorf, D
Paraffin II	Microm, Walldorf, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Proteinladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Random Primers	Promega, Mannheim, D
RNAsin	Promega, Mannheim, D

Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Taq Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
TRIzol Reagent	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Tween 20	Roth, Karlsruhe, D
Ultra Pure Water	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.1.3 Versuchstiere und Zelllinien

C57Bl/6	P. Matthias, FMI for Biomedical Research, Basel, CH
HDAC6 Y/-	P. Matthias, FMI for Biomedical Research, Basel, CH
H4IIE Leberzellen (Ratte) CRL-1548	LGC Standards GmbH, Wesel, D

2.1.4 Material Tierversuch

0,9% Kochsalzlösung, steril	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
Dexahexal 4mg/ml PZN 1276885	Hexal, Holzkirchen, D
Glucosemessgerät Precision Xceed	Abbott Diabetes Care Ltd., Witney, UK
Glucoseteststreifen Precision Xtra Plus	Abbott Diabetes Care Ltd., Witney, UK
Glucosteril 20%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
Insuman Rapid 40 I.E./ml Insulin	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, D
Kapillaren EDTA	Sarstedt, Numbrecht, D
Spritzen BD Discardit II	BD, Heidelberg, D

2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer A – Perfusionspuffer zur Hepatozytenisolation

50ml EBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})

0,5mM EGTA

Puffer B – Verdaupuffer zur Hepatozytenisolation

50ml HBSS

0,3mg/ml Kollagenase Typ 1

Proteinlyse-Puffer für 500ml

50 mM Tris pH 7,5

150 mM NaCl

5 mM MgCl_2

1% Nonidet P-40

2,5% Glycerol

1mM EDTA

50mM NaF

1mM Na_3VO_4

10mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

100 μ M Phenylmethylsulfonylfluorid

Zugabe von einer Tablette Proteaseinhibitoren "Complete Mini"

Mini 1:10 (d.h. 1 Tablette in 10ml Puffer) oder Maxi 1:50 restlicher Puffer kann bei -20C weggefroren werden. Verwendung nur nach erstmaligem Auftauen

Puffer C – Proteinlyse-Puffer für die zytoplasmatische Fraktion

50 mM Tris, pH 7.2

250 mM sucrose

10mM KCl

1 mM EDTA

10 mM NaF

2 mM Na₃VO₄

1 mM DTT

1 mM PMSF

Puffer N - Proteinlyse-Puffer für die nukleäre Fraktion

50 mM Tris, pH 7.2

25% glycerol

420 mM NaCl

1.5 mM MgCl₂

10 mM NaF

1 mM DTT

1 mM PMSE

0.1% SDS

1% NP-40

1,5M Trenngel Puffer pH 8,8

18,15g Tris-Base

pH mit HCl auf 8,8 einstellen

mit ddH₂O auf 100ml auffüllen

0,5M Sammelgel-Puffer pH 6,8

6,05g Tris-Base

pH mit HCl auf 6,8 einstellen

mit ddH₂O auf 100ml auffüllen

10x Elektrophoresepuffer (EPP)

30,13g Tris-Base (0,25M)

144g Glycin (1,92M)

100ml 10% SDS (1%)

Mit H₂O auf 1L auffüllen

1x Elektrophoresepuffer

10x EPP 1:10 verdünnen

Blotpuffer (Towbin)

3,13g Tris-Base (0,025M)

14,4g Glycin (0,192M)

5ml 10% SDS (0,05%)

200ml Methanol (20%)

Mit ddH₂O auf 1L auffüllen

Blockpuffer

2,5g Milchpulver (5%)

Mit TBST auf 50ml auffüllen

10x TBS pH 7,6

24,22g Tris-Base

87,6g NaCl

pH mit HCl auf 7,6 einstellen

Mit ddH₂O auf 1L auffüllen

1x TBST

100ml 10x TBS

1ml Tween-20

Mit ddH₂O auf 1L auffüllen

Coomassie-Stammlösung

1g Coomassie in 100ml ddH₂O

Coomassie zur Verwendung

31,25ml Stammlösung

125ml Methanol

25ml Essigsäure

6x Laemmli-Puffer

7ml 1M Tris-Base pH 6,8

1g SDS

3ml Glycerol (40%)

0,93g Dithiothreitol

60µl Bromphenol-Blau 2%

3ml ddH₂O

2.1.6 Western Immunoblotting

2.1.6.1 Reagenzien

Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Solingen, D
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Solingen, D
G153A+B Developer	AGFA, Köln, D
G354 Rapid Fixer	AGFA, Köln, D
Polyvinylidenfluorid-Membranen	GE Healthcare, Solingen, D
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Solingen, D
Whatman Filter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D

2.1.6.2 Antikörper

Anti GAPDH, Rabbit	abCam, Cambridge, UK
Anti HDAC6, Rabbit	Acris Antibodies GmbH, Herford, D
Anti IRS-1 [pY612], Rabbit	Biosource/Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Anti Acetylated-Lysine, Rabbit	Cells Signalling/New England Biolabs, Frankfurt a.M., D
Anti Akt, Rabbit	Cells Signalling/New England Biolabs, Frankfurt a.M., D
Anti Histone H4 (L64C1), Mouse	Cells Signalling/New England Biolabs, Frankfurt a.M., D
Anti Acetyl Lysine, Rabbit	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Anti HSP90, Mouse	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Anti Akt [pSer473], Rabbit	R&D Systems, Wiesbaden, D
Anti Beta-Actin, Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Anti GR (H-300), Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D

Anti HSP90a/b (F-8), Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Anti alpha-Tubulin, Mouse	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Anti Acetylated-Tubulin, Mouse	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Anti IRS-1, Rabbit	Upstate/Millipore GmbH, Schwalbach, D
Anti PEPCK, Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Anti G6P, Goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D

2. Antikörper Meerrettichperoxidase konjugiert donkey anti-mouse	DIANOVA GmbH, Hamburg, D
2. Antikörper Meerrettichperoxidase konjugiert donkey anti-rabbit	DIANOVA GmbH, Hamburg, D
2. Antikörper Meerrettichperoxidase konjugiert donkey anti-goat	DIANOVA GmbH, Hamburg, D

2.1.7 Kits

Amplex Red Glucose Assay Kit	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce/Thermo Scientific
BD Vacutainer CPT	BD, Heidelberg, D
Insulin ELISA	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Invisorb Spin Tissue Mini Kit	Invitek, Berlin, D
Mouse Cytokine Group I 5-plex	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren, D
Triglyceride FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, D
Corticosterone 125I RIA Kit	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, D

2.1.8 Medien und Zellkultur

Cell Strainer 100µM Nylon	BD, Heidelberg, D
Collagenase Typ 1	Sigma, Taufkirchen, D

Dexamethason	Sigma, Taufkirchen, D
DharmaFect 4 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Bonn, D
DMEM glucosfrei	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, D
Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Eagles Minimum Essential Medium (EMEM)	LGC Standards GmbH, Wesel, D
EBSS ohne Calcium und Magnesium	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
EGTA	Sigma, Taufkirchen, D
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, NL
Fetales bovines Serum	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
GR-eGFP	Mandy Bloch, CCR - Charité Universitätsmedizin Berlin, D
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Katheder 0,9 x 25mm, 22GA	BD, Heidelberg, D
Kollagen Typ I CELLCOAT®, 6 Well Zellkultur	
Multiwell Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Kulturflaschen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D/Falcon BD, Heidelberg, D
Kulturplatten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D/Falcon BD, Heidelberg, D
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Lipopolysaccharid (LPS)	Calbiochem/Merckl, Darmstadt, D
Natriumlactat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Niltubacin	Schreiber, S., MIT/Dana Farber Institute, Boston, USA
Opti-MEM 1x	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml / 10.000ug/ml(P/S)	Biochrom, Berlin, D
Percoll	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
siRNA	Thermo Fisher Scientific, Bonn, D
siRNA 5x Puffer	Thermo Fisher Scientific, Bonn, D

Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
TSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Tubacin	Schreiber, S., MIT/Dana Farber Institute, Boston, USA
Tubastatin A	Biovision/BioCat GmbH, Heidelberg, D
Neubauerzählkammer	Marienzell GmbH, Lauda-Königshofen, D)
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

2.1.9 Primer und Assay on Demand

Gen	forward 5'-3'	reverse 5'-3'
beta-actin Maus	GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG	GCTGATCCACATCTGCTGGAA
beta-actin Ratte	GGGAAATCGTGCGTGACATT	GCGGCAGTGGCCATCTC
Dual Specificity Protein Phosphatase 1 (Dusp1) Maus	GCGCTCCACTCAAGTCTTCT	TCTGCACTGTCAGGCACACT
Fructose 1,6-bisphosphatase (Fbp) Maus	GTATCGCTGGCTCAACCAAT	CAAGAACACAGGTAGCGTAGGA
Fructose 1,6-bisphosphatase (Fbp) Ratte	GCTCAACTCGATGCTGACTG	GCACACAGGTGCTGTAGGAG
Glucose 6-phosphatase, katalytisch (G6p) Maus	CCTGAGGAACGCCTTCTATG	ATACGGGCGTTGTCCAAAC
Glucose 6-phosphatase, katalytisch (G6p) Ratte	TCTACCTTGCGGCTCACTTTC	GAAAGTTTCAGCCACAGCAATG
Glucocorticoid Rezeptor (GR) Maus	ATTATGGGGTGCTGACGTGT	TTCCAGGTTCAATCCAGCTT
Histon Deacetylase 6 (Hdac6) Maus	Assay on demand (Applied Biosystems, Darmstadt, D)	
Histon Deacetylase 6 (Hdac6) Ratte	CATGTGCCTGCCTAGCTACA	ACAGCCAGGTGGTTGAACAT
Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS1) Maus	AAGCTATGTGGATACCTCACCAGT	AGGTGTAACAGAAGAAGAGGCTGT
Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Pepck) Maus	Assay on demand (Applied Biosystems, Darmstadt, D)	
Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Pepck) Ratte	GAATCAGCCAGATGTAATCCCG	CATTGTGCTTGCTGGTTTGC
Pyruvatcarboxylase (Pcx) Maus	GAGAACATCCGCATCAATGG	CAATGACCTTGACGAGCAGA
Pyruvatcarboxylase (Pcx) Ratte	GATGCTGGAGTCCGATTCAT	CCATAGGCAGCCTTGAAGAT
Serum/Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (Sgk1) Maus	CCAAACCCTCCGACTTTCAC	CCTTGTGCCTAGCCAGAAGAA

2.1.10 *Vektoren*

GR-eGFP

Mandy Bloch, Charité Universitätsmedizin Berlin, D

2.2 Methoden

2.2.1 *Tierversuch*

Für tierexperimentelle Untersuchungen wurden insgesamt 68 Versuchstiere, davon 34 HDAC6-defiziente, sowie 34 C57Bl/6 Geschwistertiere, von Patrick Matthias (Friedrich-Miescher-Institut, Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt (57). Diese Tiere wurden randomisiert für die Versuche in vier Gruppen (n=10 bzw. n=5) eingeteilt bevor im Alter von circa acht Wochen mit der Behandlung der Tiere begonnen wurde. Basierend auf Ergebnissen von Bernal-Mizrachi et al. (141) wurden die Tiere drei Wochen lang entweder mit Dexamethason 1mg/kg KG bzw. mit 0,9% NaCl behandelt bevor sie anschließend metabolisch phänotypisiert wurden. Drei Tage nachdem alle in vivo Untersuchungen abgeschlossen waren, wurden die Tiere gewogen, getötet, alle relevanten Organe entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren bzw. zur späteren immunhistochemischen Untersuchung in 10% Formalinlösung gegeben.

2.2.2 *In vivo*

2.2.2.1 Intraperitonealer Glucosetoleranztest (ipGTT)

Die erste Gruppe von Tieren (n=10) wurde nach drei-wöchiger Behandlung hinsichtlich ihrer Glucosetoleranz mittels ipGTT untersucht. Für diese Untersuchung wurde den Tieren nach nächtlicher Fastenperiode 1g/kg Glucoselösung intraperitoneal injiziert und zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90, 120 min nach der Injektion, die Glucosekonzentration im Blut, welches aus der Schwanzvene entnommen wurde,

bestimmt. Die Glucosetoleranz wird im Diagramm durch die Kurve der gemittelten Glucoseverlaufskonzentrationen der einzelnen Gruppen dargestellt. Vereinfacht wird diese Glucosetoleranz, durch die Fläche unter der Glucoseverlaufskurve als „Area Under the Curve“ (AUC) bezeichnet gezeigt. Die Berechnung der AUC erfolgte mit der Trapezformel.

2.2.2.2 Insulintoleranztest

Die zweite Versuchsgruppe (n=5) wurde ausschließlich für die Untersuchung der Insulinsensitivität verwendet. Diese Tiere wurden nach dreiwöchiger Behandlung einem ITT unterzogen. Hierfür wurde den Tieren nach vierstündiger Fastenperiode 0,5U/kg KG Insulin intraperitoneal injiziert und zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min nach Verabreichung, die Glucosekonzentration im Schwanzvenenblut bestimmt. Die Konzentrationen wurden relativ zum Ausgangswert der jeweiligen Gruppe als Kurve der gemittelten Glucoseverlaufskonzentrationen im Diagramm dargestellt. Vereinfacht wird die Insulinsensitivität als reziproker Wert zur Insulinresistenz zusätzlich durch die AUC gezeigt.

2.2.2.3 Stoffwechsellkäfige

Die Stoffwechsellkäfige LabMaster dienen der Erfassung des CO₂-Ausstoßes und O₂-Aufnahme, der aufgenommenen Futter und Wassermenge, sowie der lokomotorischen Aktivität der eingesetzten Tiere. Der Sensor zur Bestimmung der Zusammensetzung der ausgeatmeten Luft, wird vor dem Versuch mit einem definierten CO₂/O₂ Gasgemisch, welches durch einen leeren Käfig geleitet wird kalibriert, so dass anschließend die Anteile der beiden Gase in der ausgeatmeten Luft der Tiere bestimmt werden können. Eine Messung findet hierbei alle 15 Minuten statt. Die automatisierte Bestimmung des respiratorischen Koeffizienten erfolgt nach einer 24-stündigen Messung mit der Formel nach Frenz (180,181).

Die Bestimmung der lokomotorischen Aktivität erfolgte mittels Infrarot-Lichtschranken, die für X-, Y- und Z-Achse angebracht sind.

2.2.3 *Ex vivo*

2.2.3.1 Isolation und Kultivierung primärer Hepatozyten

Für die Isolation HDAC6-defizienter und Wildtyp Hepatozyten aus Mausleber standen jeweils vier Mäuse im Alter von 10 bis 14 Wochen zur Verfügung. Die Tiere wurden zunächst narkotisiert und anschließend der Bauchraum durch einen Schnitt durch die Haut und Muskelschicht transvers eröffnet um die inneren Organe freizulegen. Die Vena Cava, durch welche Blut aus der Leber ausströmt, wurde freigelegt und ein Katheder eingeführt. Die Perfusion mit, auf konstant 37°C temperiertem, Puffer A wurde mit einer Geschwindigkeit von 2ml/min begonnen. Kurz nach Perfusionsbeginn wurde die Portalvene durchtrennt und die Perfusion für 10-15 min durchgeführt. Da das Blut während dieses Prozesses aus der Leber gespült wird, entfärbt sich die Leber zu einem bleichen Braunton. Der Perfusion folgte der Kollagenverdau mittels Puffer B, der bei gleichen Bedingungen 20-25 min durch die Leber gepumpt wurde. Dabei schwoh die Leber zusehends an, wurde nach beendeter Perfusion entnommen und in ein mit, auf 37°C vorgewärmtes, DMEM gefülltes 50mL Falcon überführt.

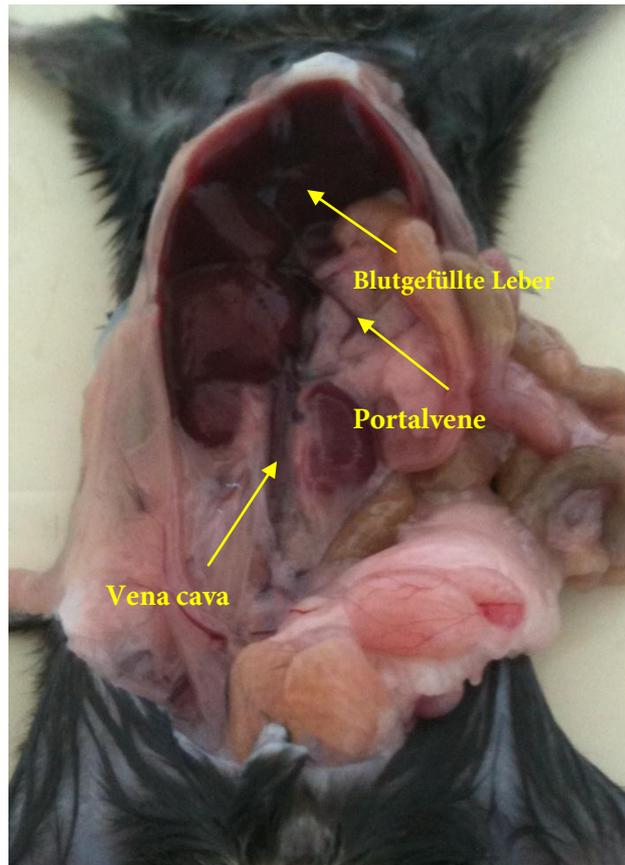


Abbildung 2.1 Eröffneter Bauchraum mit freigelegter Leber einer C57Bl/6 Maus vor der Perfusion. Dargestellt sind die Vena cava, in die der Katheder zur Perfusion eingeführt wird, die Portalvene, die kurz nach Beginn der Perfusion durchtrennt wird und die noch blutdurchströmte Leber.

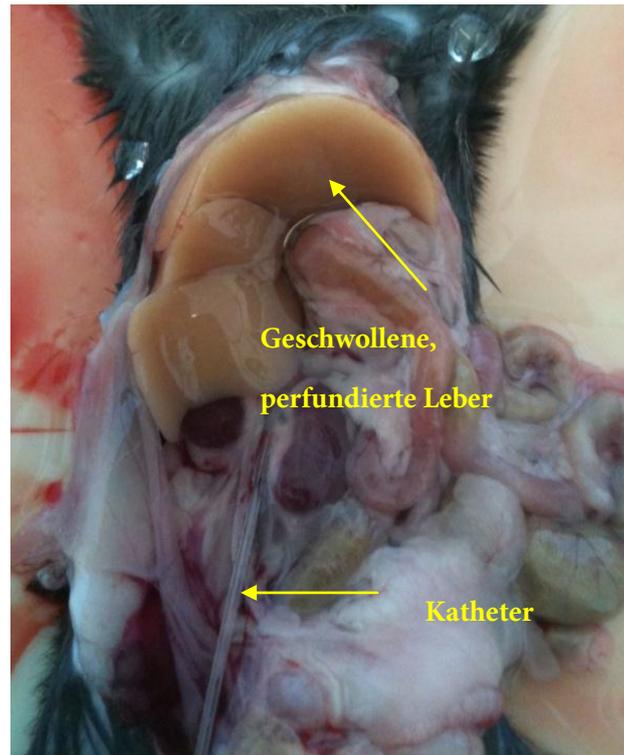


Abbildung 2.2 Ansicht desselben Tieres kurz vor beendeter Perfusion. Die Leber ist zu einem blassen Brauntönen durch Ausspülen des Blutes entfärbt und angeschwollen. Der Katheter wurde anschließend entfernt, die Leber herausgetrennt und die Hepatozyten aus der Leberkapsel zur Kultivierung isoliert und ausgeeinzelt.

Anschließend erfolgte die grobe Zerkleinerung der Leber mittels Zellschabern. Das Medium trübte sich und diese Suspension wurde daraufhin durch ein $100\mu\text{M}$ Zellsieb gegeben um die Zellen weiter auszueinzeln. Die entstandene Suspension wurde 3 min bei 680 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Percollpuffer resuspendiert und bei 680rpm 10min zentrifugiert. Der Überstand, welcher totes Gewebe enthielt wurde verworfen und das Pellet drei Mal in jeweils 50ml DMEM gewaschen. Anschließend wurde die Viabilität durch Trypanblaufärbung bestimmt und die Zellen mittels Hemozytometer gezählt. Die Viabilität betrug bei allen Isolationen $>90\%$. 1×10^6 isolierte Hepatozyten wurden anschließend in jeweils ein Loch einer kollagenbeschichteten 6-Lochplatte ausgesät. Als Kulturmedium wurde DMEM, versetzt mit 10% FBS und 1%P/S, verwendet und dieses nach 4h Inkubation der Zellen

bei 37°C erneuert. Anschließende Experimente wurden grundsätzlich am Folgetag begonnen.

2.2.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der GR-Translokation in primären Hepatozyten

Die Transfektion des GR-eGFP-Plasmids erfolgte mittels Lipofectamine für 24h nach folgendem Protokoll:

Für je 1 Loch einer 6-Lochplatte wurde folgender Transfektionsmix vorbereitet: 20µl Lipofectamin wurden zu 30µl OPTI-MEM gegeben und 5 min bei RT inkubiert. 4µg des Plasmids wurden zu 50µl in OPTI-MEM gelöst. Beide Lösungen wurden anschließend miteinander vermischt und 20 Minuten bei RT inkubiert.

Die Hepatozyten wurden mit 2ml Medium frischem Medium ohne FBS versorgt, der Transfektionsmix aufpipettiert und die Platte anschließend geschwenkt, bevor Sie für 24h inkubiert wurde.

Nach 24h wurden die transfizierten Hepatozyten 20min mit 10nM dex bzw. Vehikel behandelt und die intrazelluläre Lokalisation des GR anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

2.2.3.3 Glucose Assay

Nach Kultivierung der primären Hepatozyten in FBS-freiem DMEM über Nacht, wurden die Zellen mit 500nM dex bzw. Vehikel für 24h stimuliert, nach 20 Stunden erfolgte, nach zweimaligem Waschen mit PBS um Glucosereste zu entfernen, ein Wechsel auf 1ml glucosefreies Medium, welches mit 2mM Natriumpyruvat, 20mM Natriumlactat sowie 500nM dex bzw. Vehikel versetzt war. Nach vier weiteren Stunden Inkubation, wurden 500µl Überstand entnommen, das restliche Medium abgesaugt und die Hepatozyten mit 100µl Proteinlyse-Puffer geerntet. Der entnommene Überstand

wurde bei 12000 rpm zentrifugiert und die Glucosekonzentration im Überstand mittels Amplex Red Glucose Assay Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Die Glucosemenge wurde auf den Gesamtproteingehalt, der UV-photospektrometrisch mittels BCA Methode bestimmt wurde, normalisiert.

2.2.3.4 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)

Die PBMC wurden mit dem Vacutainer CPT™ System der Firma Becton Dickinson basierend auf der Methode der Ficoll-Hypaque Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert (182).

Den Versuchstieren wurde retrobulbär mittels Kapillaren Blut entnommen. Je einer Maus konnte circa 1ml Blut entnommen werden. Jeweils 0,5ml dieses Bluts einer jeden Maus einer Gruppe wurde vereinigt (gepoolt), um genug Ausgangsmaterial für die Isolation der PBMC zur Verfügung zu haben. Das gepoolte Blut wurde in Vacutainer CPT™ überführt, diese verschlossen, acht bis zehn Mal invertiert und anschließend bei 1650g und Raumtemperatur für 20 Minuten zentrifugiert. Im Vacutainer sammelt sich durch die Zentrifugation an oberster Stelle das Plasma (gelb), darunter eine Schicht der PBMC (weiß), dann die Dichtegradientenlösung und eine aus Polyester bestehende Trennschicht (weiß) und darunter dann die Granulozyten (weiß) und roten Blutkörperchen (rot). Das Plasma wurde mit einer Pipette vorsichtig entnommen. Zu den verbliebenen PBMC wurde vorgewärmtes PBS bis zu einer Füllhöhe von 1cm gegeben und vorsichtig gemischt. Die Mixtur wurde in ein Greinerröhrchen überführt. In den Vacutainer wurde dieselbe Menge PBS gegeben und auch diese in das Greinerröhrchen überführt um die Ausbeute an Zellen zu maximieren. Im Greinerröhrchen wurde das Volumen mit vorgewärmtem PBS auf 14ml aufgefüllt und die Röhrchen anschließend bei 300g und Raumtemperatur 15 Minuten zentrifugiert. Die PBMC setzen hierbei sich am Boden ab. Der Überstand wird verworfen und die Zellen erneut wie zuvor mit PBS gewaschen, jedoch nur 10 Minuten zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde daraufhin in 2ml PBS resuspendiert und mittels Trypanblau die Gesamtzahl der Zellen bestimmt sowie die Viabilität überprüft.

Die Suspension wurde schließlich in ein 2ml Eppendorf Reagenzgefäß überführt und erneut bei 300g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren bevor die Zellen zur RNA-Isolation herangezogen wurden.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Gesamt-RNA Isolation

Tierisches Gewebe

Das entsprechende Gewebe wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt und gemörsert. Anschließend wurden ca. 80mg Gewebe abgewogen und mit 1mL TRIzol® versetzt. Das Gewebe wurde mit einem Homogenisator für 20sec weiter zerkleinert und anschließend 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dieser Suspension wurde 0,2mL Chloroform gegeben und dieses Gemisch 15sec geschüttelt. Nach 2 min Inkubationszeit wurden die Proben bei 12000g und 4°C 15 min lang zentrifugiert und anschließend die obere, wässrige Phase abgenommen. Zu diesem Überstand wurde 0,5mL Isopropanol gegeben, invertiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 12000g und 4°C für 10 min wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 1mL 75% Ethanol gewaschen, 10 min bei RT getrocknet und in 40µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Möglicherweise mitextrahierte DNA wurde mittels RQ1 RNase-free DNase (Promega) entsprechend den Angaben des Herstellers verdaut und die RNA anschließend durch Messung der optischen Dichte bei 260nm und 280nm Wellenlänge UV-photospektrometrisch an einem Nanodrop ND1000 quantifiziert.

Kultivierte Zellen

Sowohl H4IIE Rattenleberzellen als auch primäre Hepatozyten wurden mittels eines Gemisches aus RA1 Puffer (NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel) und 1% v/v β -Mercaptoethanol lysiert und anschließend über Säulen gemäß den Angaben den Herstellers aufgereinigt. Diese Prozedur schließt einen DNase-Verdau mit ein und resultiert in aufgereinigter, gelöster RNA, welche anschließend UV-photospektrometrisch (s.o.) quantifiziert wurde.

2.2.4.2 Reverse Transkriptase Reaktion zur cDNA Synthese

Die RNA-Proben wurde so in RNase-freiem Wasser verdünnt, dass jeweils 500ng RNA in 13,5 μ l Lösung enthalten waren. Dazu wurden je 1 μ l Random Primer (entsprechen 100ng) gegeben.

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde folgender Mastermix hergestellt, von dem jeweils 5,5 μ l zu jeder Probe gegeben wurde, nachdem diese bei 70°C 5min inkubiert wurden:

4 Teile 5x M-MLV Buffer

1 Teile 10mM dNTPs

0,25 Teile M-MLV Reverse Transkriptase

0,25 Teile RNasin

Nach Zugabe des Mastermixes wurden die Reagenzgefäße mehrmals invertiert, anschließend zentrifugiert und dann 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben kurzfristig bei 4°C oder langfristig bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Real-time quantitative PCR

Alle durchgeführten Genexpressionsanalysen wurden mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) durchgeführt, welche eine etablierte Methode darstellt aus mRNA umgeschriebene cDNA bekannter Nukleotidsequenzen zu vermehren und zu quantifizieren (183). Die Methode basiert darauf, dass spezifische Oligonukleotidprimer komplementär an gegenläufige DNA-Stränge binden und die zu analysierende Zielsequenz einschließen. Während der qPCR binden die Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA und die DNA-Polymerase verlängert die Primer entlang der DNA-Matrize Nukleotid für Nukleotid. Somit entstehen spezifische zum Template komplementäre DNA-Sequenzen. Für diesen Schritt ist zunächst eine Denaturierung Voraussetzung (initial 10 Minuten bei 95°C, anschließend zu Beginn jedes Zyklus 30sec bei 95°C), bei der die DNA in Einzelstränge aufgespalten wird. Daraufhin folgt die sogenannte Annealingphase (primerspezifische Temperatur und Länge), während der sich die Oligonukleotidprimer an die DNA-Einzelstränge anlagern. In der dritten und letzten Phase, der Elongation (30sec bei 72°C), wird die von den Primern eingeschlossene Sequenz schließlich vervollständigt. Die qPCR ist ein zyklisches Verfahren. Die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wird dementsprechend durch den vielfachen Ablauf dieser drei Phasen erreicht.

Die verwendeten Primerpaare waren entweder am CCR Etablierte, aus Publikationen Entnommene oder mit Hilfe der Open Source Software Primer3 (184), die von Steve Rozen am Howard Hughes Medical Institute entwickelt wurde, Erstellte. Die Primer wurden in Konzentrationen und bei Temperaturen verwendet, die eine optimale Effizienz gewährleisteten.

Die Quantifizierung in Echtzeit (real time) wird ermöglicht durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, die mit der DNA interkalieren. Die laserinduzierten Fluoreszenzsignale der doppelsträngigen DNA werden nach jedem Zyklus und zu Ende der qPCR gemessen und somit die Menge des PCR Produkts quantifiziert.

Zum Ende der Amplifikation wurde generell eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, um die Bildung von Primerdimeren auszuschließen.

Alle Proben wurden als dreifache Replikate in einer 96-Lochplatte als Bestandteil eines Puffers bestimmt, der neben dem Probenmaterial einen Mix der 4 dNTPs ATP, CTP, GTP und UTP, SYBR Green Master Mix und die spezifischen Primern enthielt. Parallel wurde für jedes Gene-of-interest ein sogenanntes Housekeeping Gene bestimmt. Dies ist ein Gen, das unter den genannten Versuchsbedingungen keiner Regulation hinsichtlich der mRNA Expression unterliegt. Für die durchgeführten Versuche wurde β -Actin gewählt. Auf die Expression dieses Housekeeping Genes wurde die Expression des Gene-of-interest anschließend mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode relativiert und somit ausgewertet(185).

2.2.4.4 Microarray

Die isolierte RNA wurde mit dem WT cDNA Synthesis & Amplification kit umgeschrieben und das Markieren wurde mit dem WT Terminal Labeling kit von Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Die GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Arrays wurden dem "GeneChip Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay Manual" (Affymetrix, Santa Clara, CA) entsprechend hybridisiert, mit einer Hybridisierungszeit von 16 Stunden. Für die Waschschritte wurde das Affymetrix Fluidics protocol FS450_0007 verwendet. Das Scannen der Chips wurde mit Affymetrix GCC Scan Control v. 3.0.1 auf einem GeneChip® Scanner 3000 with autoloader (Affymetrix) durchgeführt.

Die Probesets wurden zusammengefasst und normalisiert mit der justRMA()-Funktion von R (Version 2.10.0) / Bioconductor (Version 2.5) package affy mit CDF environment MoGene-1_0-st-v1.r3.cdf (as provided by Bioconductor) und Annotation von Netaffx (www.netaffx.com).

Unterschiedlich exprimierte Gene wurden mit Hilfe der empirischen Bayes Methode (F Test) identifiziert, in das LIMMA Packet implementiert und bereinigt mit der false discovery rate (FDR) Methode nach Wettenhall JM Smyth GK(186). Probesets mit einem durchschnittlichen log 2 Kontrastsignal von mindestens 4, einer Anpassung des p-Wertes auf <0.01, und einer absoluten log 2-fachen Änderung von >0.585 (linear 2-fach) wurden ausgewählt und führten zur Identifikation von 313 und 317 durch Dexamethasonbehandlung verändert regulierten Genen in den Wildtyp und den HDAC6 Knockout-Proben.

Die Rohdaten des Microarray sind frei verfügbar und abrufbar in der Gene Expression Omnibus Database unter der Bezeichnung GSE34229.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinisolation

tierisches Gewebe - Gesamtprotein

Das entsprechende Gewebe wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt und gemörsert. Anschließend wurden zu ca. 100mg Gewebe 300µl Proteinlyse-Puffer gegeben und das Gewebe mit einem Homogenisator weiter zerkleinert. Diese Suspension wurde anschließend bei 12000rpm und 4°C 10min lang zentrifugiert um Zellreste abzutrennen. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und dieses bei -20°C aufbewahrt, sofern nicht sofort mit der Analyse fortgefahren wurde.

tierisches Gewebe – getrennte Aufarbeitung der Proteine aus Zellkern und Zellplasma

Um nukleäre und zytoplasmatische Proteine getrennt zu isolieren, wurde nach dem Mörsern, ca. 50mg des Gewebes mit 1ml 4°C kaltem Puffer C (Verhältnis 1:20 m/v) versetzt und mit einem auf 4°C gekühlten Dounce Homogenisators weiter zerkleinert, bis keine festen Bestandteile mehr sichtbar waren. Das Gemisch wurde in ein

vorgekühltes 2ml Reaktionsgefäß gegeben und bei 4°C 30 min lang auf einem Rotationsrad gedreht. Nach anschließender 30minütiger Zentrifugation bei 1000g und 4°C wurde der Überstand als zytoplasmatische Fraktion abgenommen und bei -20°C eingefroren. Das Pellet wurde in 500µl Puffer N durch mehrmaliges auf- und abpipettieren resuspendiert und dieses Gemisch wiederum 30 min bei 4°C rotiert. Nach Zentrifugation bei 9000g und 4°C für 30 min wurde der Überstand als nukleäre Fraktion weggefroren.

kultivierte Zellen

Zur Isolation des Gesamtproteins aus H4IIE Zellen wurden diese 2 Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und daraufhin je 100µl Proteinlyse-Puffer in ein Loch einer 6-Lochplatte gegeben. Diese Platte wurde bei 4°C 20min geschwenkt, der Puffer anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 12000rpm und 4°C 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieses bei -20°C aufbewahrt, sofern nicht sofort mit der Analyse fortgefahren wurde.

2.2.5.2 Quantifizierung der Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte kolorimetrisch basierend auf der Biuret-Reaktion und der Färbung mittels Bicinchoninsäure. Bei dieser Quantifizierungsmethode reduzieren die Proteine in alkalischem Milieu quantitativ zweiwertige Cu²⁺-Ionen zu einwertigen Cu⁺-Ionen. Die Cu⁺-Ionen bilden dann mit Bicinchoninsäure einen wasserlöslichen, violetten Chelatkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562nm spektralphotometrisch analysiert wird.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde jeweils mit den BCA Reagenzien der Firma Pierce/Thermo Scientific durchgeführt. Dabei wurden die Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 gemischt um einen Mastermix herzustellen.

Jeweils 5µl der Proben in angemessener Verdünnung sowie eine BSA-Standardverdünnungsreihe wurden in Duplikaten in eine 96-Lochplatte pipettiert. 100µl des Mastermixes wurden jeweils dazu gegeben und die Platte anschließend 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde die Absorption der einzelnen Proben und Standards UV-photospektrometrisch bei 562nm gemessen und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mittels Standardgerade bestimmt. Die Verdünnung wurde stets so gewählt, dass die gemessene Absorption im linearen Bereich (zwischen 0,2 und 0,9) der Standardkurve lag und somit das Lambert-Beersche-Gesetz Gültigkeit für die Quantifizierung besaß.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Western Immunoblotting (187)

Gel-, Probenvorbereitung und SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung der Proteine in einem Gel nach ihrer Größe. Das SDS bewirkt dabei eine Denaturierung der Proteine und gleichzeitig eine Bildung eines SDS-Protein-Komplexes, der aufgrund seiner negativen Ladung und einem konstanten Ladungs- zu Masse-Verhältnis eine Auftrennung nach der Größe der Proteine ermöglicht. Durch Anlegen einer konstanten Spannung wandern die Proteine mit ihrer Größe entsprechenden Geschwindigkeiten durch die Polyacrylamidmatrix des Gels zum Pluspol.

Die Güte der Auftrennung wurde nach dem Blotten durch Färbung des Gels mit Coomassie Lösung (10 Minuten) und anschließender Entfärbung mit H₂O über Nacht kontrolliert.

Western Blot

Die durch die SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektrophorese auf PVDF-Membran im Nassblot-Verfahren übertragen. Diese

Membranen wurden vor Benutzung zur Aktivierung 5min in Methanol vorinkubiert. Anschließend wurde die Blot Apparatur in folgender Weise ausgehend von der Anode zusammengesetzt: Halterung, Schwamm, 3xWhatman-Filter, Gel, PVDF-Membran, 3xWhatman-Filter, Schwamm, Halterung. Die Halterung wurde daraufhin in die Blotapparatur geschoben, diese mit Towbinpuffer aufgefüllt und bei 100V 60-80 Minuten unter Kühlung geblottet.

Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen wurde die Membran anschließend mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in TBST versetzt mit 5% entfettetem Milchpulver geschüttelt.

Der jeweilige 1. Antikörper, welcher spezifisch gegen das zu analysierende Antigen gerichtet ist, wurde unter konstantem Schütteln in vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen über Nacht bei 4°C in 5% Milch in TBST an das Antigen gebunden.

Die Membran wurde am Folgetag 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen, anschließend der entsprechende 2. Antikörper für eine Stunde in 2% Milch in TBST mit der Membran bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach weiteren 3 x 10-minütigen Waschschritten wurden die Signale auf der Membran mittels ECL-Reagenz und Photofilm detektiert.

2.2.5.4 Bestimmung des Seruminsulins mittels ELISA

Unmittelbar vor der Tötung der Versuchstiere wurde Blut mittels EDTA benetzten Kapillaren retrobulbär entnommen. Das Blut wurde ca. 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt, anschließend gekühlt, bis bei sämtlichen Tieren Blut entnommen war, und daraufhin zentrifugiert (1000g, 15min bei 4°C) um geronnene Bestandteile abzutrennen und Blutserum zu erhalten. Dieses wurde bis zur Durchführung der Insulinbestimmung bei -80°C gelagert und die Bestimmung nach Auftauen der Proben nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5.5 Corticosteron Radioimmunoassay (RIA)

Im Gegensatz zum Menschen, ist bei Nagern nicht Cortisol, sondern Corticosteron das grundsätzlich produzierte endogene Glucocorticoid. Die Sekretion erfolgt durch die Nebennierenrinde nach einem circadianen Rhythmus und wird, ebenso wie beim Menschen durch einen komplexen negativen Feedback Mechanismus gesteuert. Durch die Behandlung mit exogenen Glucocorticoiden wird die Sekretion durch diesen negativen Rückkopplungsmechanismus vermindert. Um die Wirksamkeit des Dexamethasons zu überprüfen und aufzuzeigen, ob es zwischen den unterschiedlichen Genotypen Differenzen, hinsichtlich der endogenen Sekretion und auch unabhängig von der Behandlung gibt, wurde die Corticosteronserumkonzentration mit Hilfe eines RIA bestimmt.

Das Prinzip eines RIA gleicht dem eines ELISA, mit dem Unterschied, dass keine Messung basierend auf einer enzymatischen Reaktion, sondern auf der Strahlungsintensität eines radioisotopmarkierten Antigens erfolgt.

Für den Assay werden definierte Mengen Antikörper eingesetzt, die mit dem radioisotopmarkierten, zu analysierenden Hormon, in diesem Fall ¹²⁵I-markiertem Corticosteron reagieren. Um eine Standardkurve zu erstellen werden nun verschiedene definierte Mengen nichtmarkierten Corticosterons zugesetzt, welche kompetitiv zum markierten Hormon an den Antikörper binden.

Anschließend wird die gleiche Menge des markierten Corticosterons den Versuchstierproben zugesetzt. Nach erfolgter Komplexbildung mit dem Antikörper und anschließendem Waschen kann dann anhand der mit einem Gamma-Counter gemessenen Strahlungsintensität und der Standardkurve die Menge des im Serum vorhandenen Corticosterons bestimmt werden.

2.2.5.6 Zytokinbestimmung mittels Bio-Plex Pro Assay

Der Bio-Plex Pro Assay dient der Bestimmung von bis zu 100 Proteinen in einer Probe mit einem Volumen von 12,5µl und ist damit besonders zur Bestimmung mehrerer Zytokine im Mausserum geeignet.

Das Prinzip des Assays gleicht dem Sandwich-Prinzip des ELISA. Ein antigenspezifischer Primärantikörper reagiert mit dem entsprechenden Biomarker. Ein biotinylierter antigenspezifischer Antikörper reagiert nach vorherigem Entfernen der ungebundenen Fraktion mit dem bereits gebundenen Antigen. Voraussetzung hierfür ist, dass der Antikörper gegen ein anderes Epitop des Antigens gerichtet ist. Es entsteht ein sogenannter Sandwich-Komplex. Der biotinylierte Antikörper wird anschließend einer Reaktion mit Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) unterzogen. Der Phycoerythrinteil dient letztendlich als Fluoreszenzindikator. Der Unterschied zum ELISA besteht darin, dass der antigenspezifische Primärantikörper an magnetische, für jeden Antikörper definiert fluoreszenzgefärbte, Mikrokügelchen gebunden wird (siehe Abbildung 2.3)

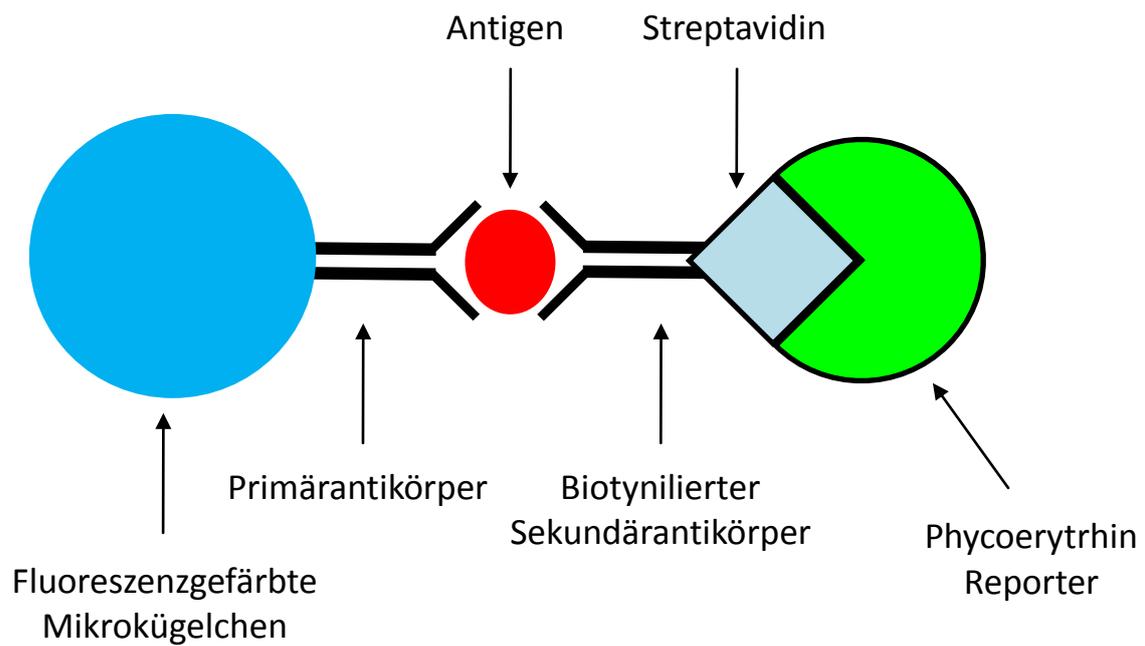


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung des sich bildenden Sandwiches bei der Proteinanalyse mittels Bio-Plex Assay

Das Quantifizierungssystem ist ein Luminex-basierter Durchflusszytometer (Bio-Plex Suspension Assay System) mit zwei Lasern. Dieses System saugt zunächst die Suspension aus dem entsprechenden Loch der 96-Lochplatte, trennt nach der Fluoreszenzfarbe der Mikrokügelchen auf und quantifiziert nach der Intensität des Phycoerythrinsignals in Relation zu einer Standardkurve des entsprechenden Zytokins.

Für die Durchführung werden spezielle Bio-Rad Filterplatten verwendet, da keine Fixierung der primären Antikörper an die 96-Lochplatten erfolgt. Die Waschschrte erfolgen vakuumbasiert und über magnetische Auftrennung.

Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers nach folgendem Schema:

Mikrokügelchen mit Antikörper koppeln

gekoppelte Mikrokügelchen auf Platte geben

Waschen

Standards, Proben, Kontrollen hinzufügen (1 Stunde)

Waschen

Detektionsantikörper hinzugeben (30 Minuten)

SA-PE hinzugeben (10 Minuten)

Waschen

Resuspendieren

Messen

2.2.6 Zellkulturtechniken und Transfektionen

2.2.6.1 Kultivierung der H4IIE Leberzellen

Die H4IIE Zellen sind Hepatomzellen der Ratte und wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers aufgetaut und in 10% FBS- und 1% P/S-haltigem EMEM kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert und die Zellen bei 80%-90% Konfluenz mittels Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst, im Verhältnis 1:4 verdünnt und erneut ausgesät. Für Versuche wurden die Zellen gezählt und je 2ml der (6×10^5 Zellen/ml) in ein Loch einer 6-Lochplatte ausgesät. Die Zellen wiesen am nächsten Tag eine Konfluenz von 60-80% auf und wurden für eine Nacht in FBS-freiem Medium kultiviert bevor Sie einer Behandlung unterzogen wurden. Für Genexpressionsanalysen wurden die Zellen zunächst 30 Minuten mit entweder 20 μ M Tubacin oder 1 μ M TSA bzw. Vehikel vorbehandelt und eine vierstündige Dexamethason- (500nM) bzw. Vehikelbehandlung schloss sich an. Das angegebene Dexamethasonstimulationsregime wurde in Vorversuchen hinsichtlich Konzentrations- und Zeitverlauf optimiert und ist des Weiteren durch Publikationen belegt (188–190).

2.2.7 Statistische Berechnungen

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe der GraphPad Software.

Alle tierexperimentell erhobenen Datensätze wurde nach Shapiro und Wilk auf Normalverteilung geprüft (191) und diese für Zellkulturexperimente aufgrund der bisherigen Erfahrungen angenommen. Grundsätzlich wurden anschließend alle Experimente auf Unterschiede, belegt durch statistische Signifikanz, mit einer 2-Weg-Varianzanalyse und anschließendem Bonferroni post-hoc Test analysiert. Für statistisch signifikante Unterschiede wurde $p < 0,05$ zugrunde gelegt.

Für alle Zellkulturexperimente gilt, dass Sie dreimal wiederholt wurden und dabei jedes Mal in Triplikaten durchgeführt wurden, tierexperimentelle Ergebnisse sind explizit angegeben jedoch immer $3 \leq n \leq 9$.

Die angegebenen Daten sind grafisch dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler.

3 ERGEBNISSE

3.1 HDAC6 Expression in unterschiedlichem Gewebe

Die Grundlage für die Hypothese und viele der durchgeführten Experimente war die Vorarbeit der Arbeitsgruppe um Patrick Matthias am Friedrich-Miescher-Institut in Basel. Diese Arbeitsgruppe analysierte mitunter auch die HDAC6 Expression in unterschiedlichem Gewebe (178) wobei ersichtlich wurde, dass das Enzym neben der Expression in den Testis und dem Gehirn, überwiegend in der Leber exprimiert wird.

Neben der Leber stellen jedoch auch das Muskel- und das Fettgewebe für den glucocorticoidvermittelten Glucosestoffwechsel und die Entwicklung der Insulinresistenz hochrelevantes Gewebe dar.

Mittels qPCR sowie Western Blot wurde die Gen- bzw. Proteinexpression in diesen drei metabolisch aktiven Gewebearten untersucht. Die HDAC6 Genexpression war in der Leber 3-3,5 Mal höher als im Fettgewebe sowie dem Skelettmuskel (Abbildung 3.1). Im Western Blot wurde bestätigt, dass HDAC6 auf Proteinebene in der Leber eine weitaus stärkere Anwesenheit zeigt, als in den beiden anderen untersuchten Gewebearten (Abbildung 3.2). Die ausgeprägte Expression des Enzyms in der Leber im Vergleich zu den anderen Geweben lässt auf eine überwiegende Relevanz des Enzyms für den Leberstoffwechsel schließen.

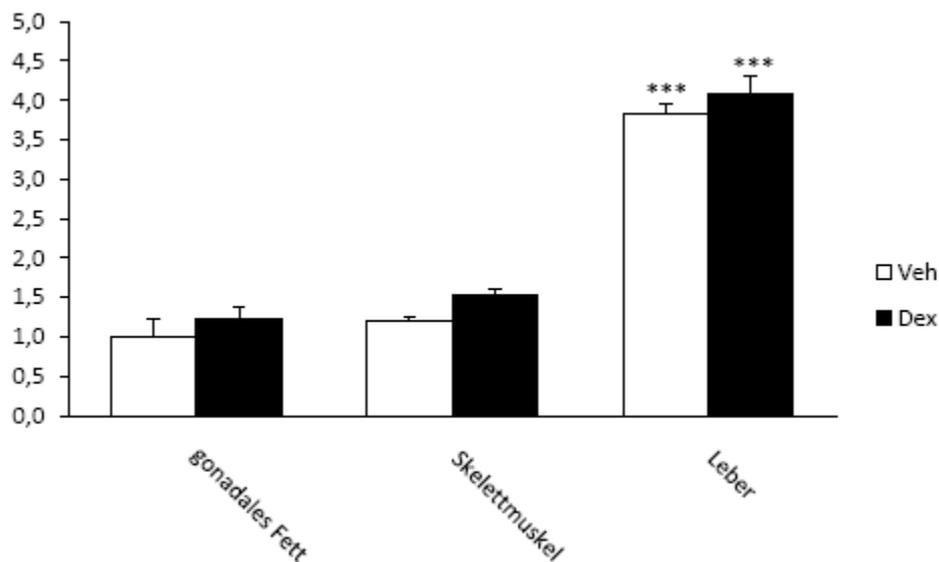


Abbildung 3.1 HDAC6 mRNA Expression in gonadalem Fett, Skelettmuskel und Lebergewebe von Vehikel- und Dexamethason- behandelten C57BL/6 Wildtypmäusen (***) $p < 0,05$ vs gonadales Fett als auch Skelettmuskel der entsprechend behandelten Gruppe).

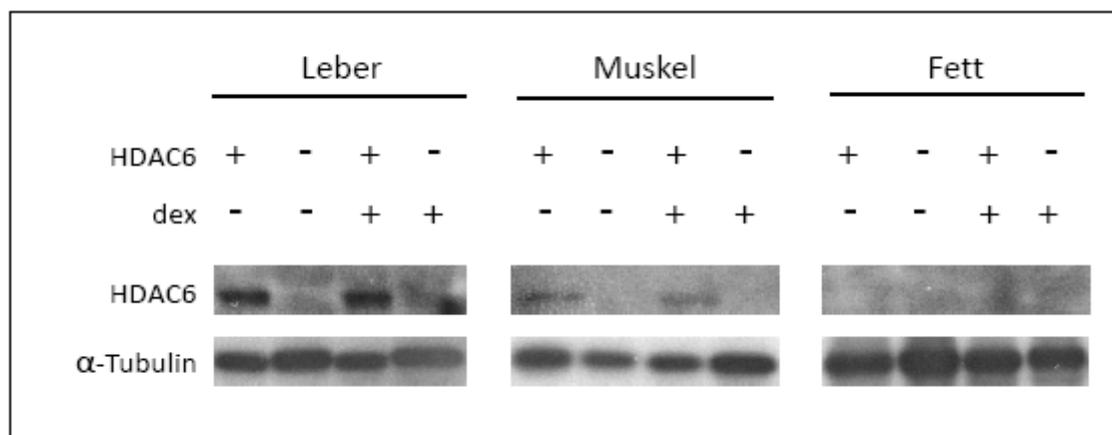


Abbildung 3.2 HDAC6 Proteinexpression in Leber-, Skelettmuskel- und gonadalem Fettgewebe der Vehikel- und Dexamethason-behandelten Versuchstiere. Die α -Tubulin Proteinexpression ist als Ladekontrolle dargestellt. (HDAC6 + entspricht den Wildtyp Mäusen, HDAC6 - entspricht den Knockout Mäusen; veh - stellt die Vehikel-behandelte Gruppen dar, dex + die Dexamethason-behandelte Gruppe)

3.2 Der HDAC6-Einfluss auf die hepatische ligandeninduzierte Glucocorticoidrezeptortranslokation

HDAC6 stellt einen wichtigen Faktor für die transkriptionelle Funktion des GRs dar. Wie bereits in diversen Studien und unterschiedlichen Zelltypen gezeigt wurde, führt fehlendes HDAC6 zu einer Hyperacetylierung von HSP90, mangelnder Bindung des GRs an HSP90, folglich verminderter Ligandenbindungsaktivität und schlussendlich verminderter Translokation des GRs (34,62,88,177,178). Um festzustellen, ob ein entsprechender Effekt in der Leber ebenfalls zu beobachten ist, wurden zunächst primäre Hepatozyten aus HDAC6 Knockout Mäusen sowie Wildtyp Geschwistertieren isoliert und die GR-Translokation aus dem Zytosol in den Nukleus nach Dexamethason-Stimulation untersucht.

Dafür wurden die Primärzellen zuvor mit einem GR-eGFP-Plasmid transfiziert und die Lokalisation des GR nach Stimulation anhand des GFP-Signals fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Wie in Abbildung 3.3 ersichtlich, war die nukleäre Fluoreszenzintensität nach Ligandenstimulation in primären HDAC6 Knockout im Vergleich zu den Wildtyp Hepatozyten abgeschwächt.

Um diese mikroskopischen Ergebnisse zu bestätigen wurden aus chronisch Dexamethason-behandelten HDAC6 Knockout Mäusen und Wildtyp Geschwistertieren zytoplasmatische sowie nukleäre Leberproteinfraktionen isoliert. In diesen wurde die Präsenz des GR mittels Western Blot analysiert und anschließend densitometrisch quantifiziert. Wie Abbildung 3.4 zeigt waren dieselben Anteile GR in Zytosol sowie Nukleus der Vehikel-behandelten Mäuse vorhanden. Betrachtet man die Dexamethason-behandelten Mäuse erkennt man, dass in den Wildtyp Mäusen eine Verschiebung des Verhältnisses zur nukleären Fraktion stattgefunden hat, wohingegen diese Verschiebung in den HDAC6 Knockout Mäusen signifikant schwächer ausgeprägt ist (siehe Abbildung 3.5). Als Kontrolle für die Beladung sowie die Reinheit der

einzelnen Fraktionen sind α -Tubulin als zytoplasmatisches und Histon H4 als nukleäres Protein mit aufgetragen worden.

Anhand der Ergebnisse dieser Experimente konnte belegt werden, dass die ligandeninduzierte GR-Translokation durch HDAC6-Defizienz eingeschränkt ist.

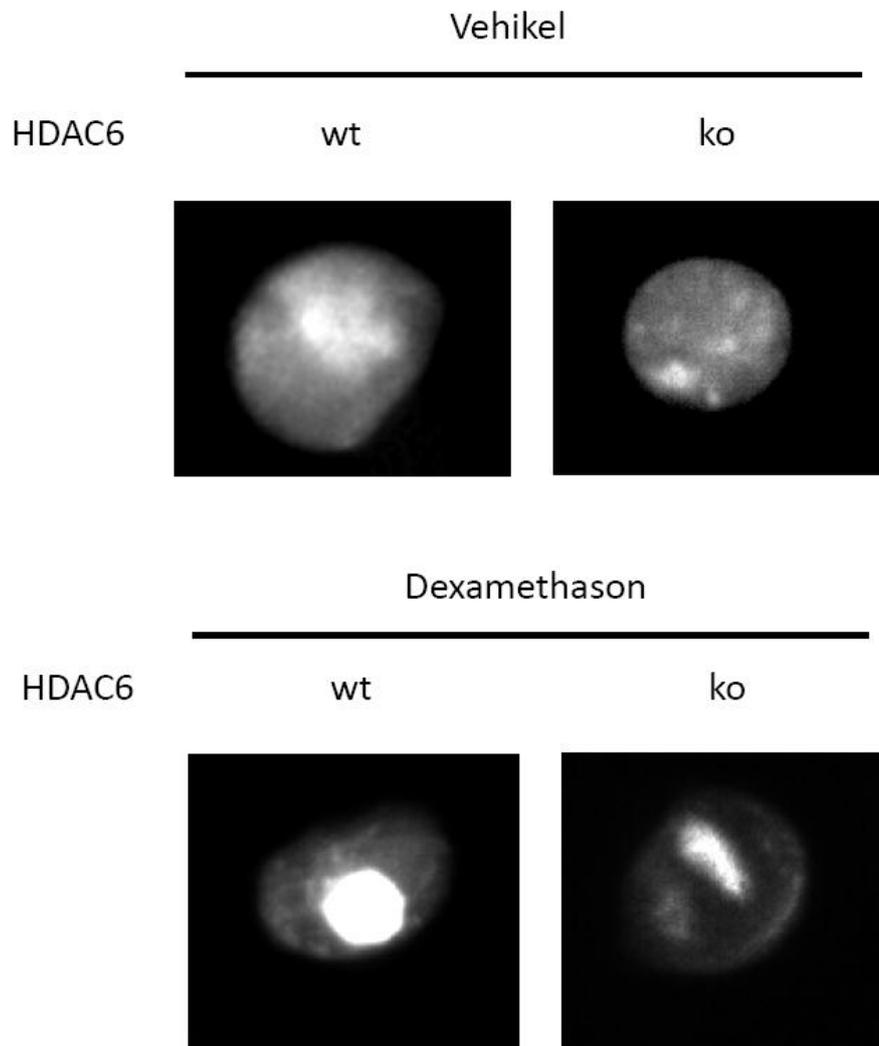


Abbildung 3.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Glucocorticoidrezeptorlokation in Vehikel- sowie Dexamethason-stimulierten primären Hepatozyten aus Wildtyp (wt) bzw. HDAC6 Knockout (ko) Mäusen.

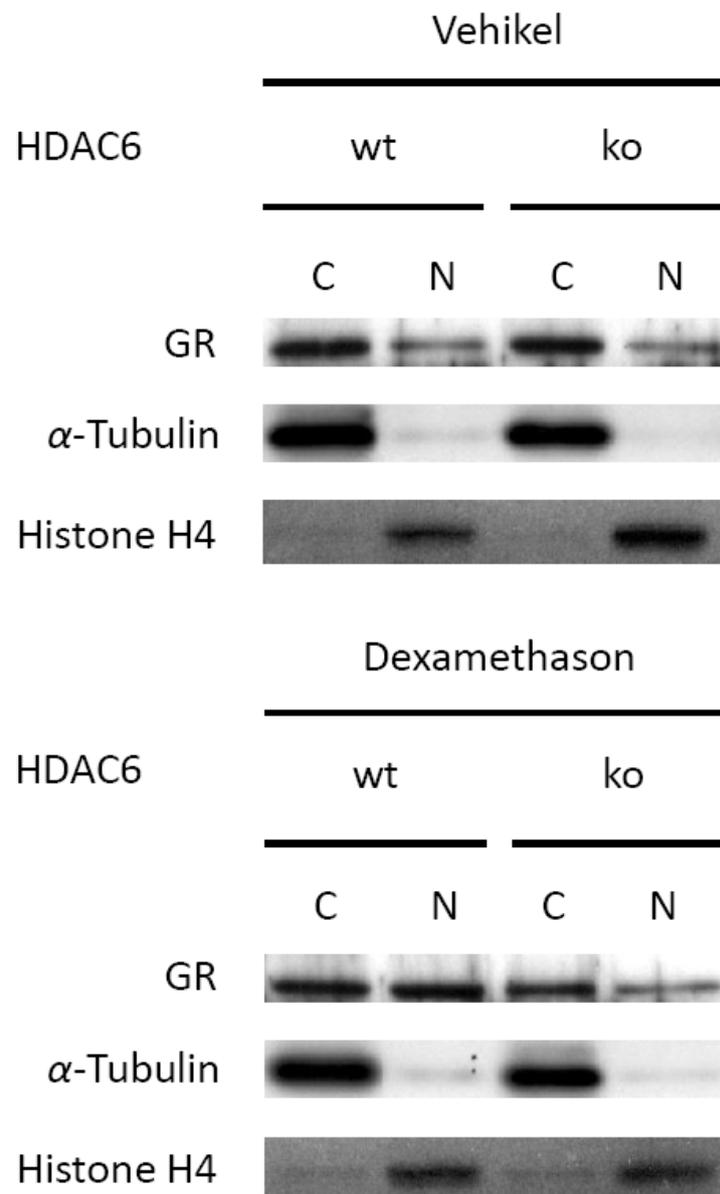


Abbildung 3.4 Glucocorticoidrezeptor (GR) Proteinexpression in zytosolischer (C) und nukleärer (N) Fraktion der Wildtyp (wt) und HDAC6 Knockout (ko) Versuchstierlebern. α -Tubulin und Histone H4 Proteinexpression sind als Kontrollen für die Güte der Auftrennung der Fraktionen sowie als Ladekontrolle dargestellt. Westernblots sind exemplarisch für jeweils 3 analysierte Tiere pro Gruppe.

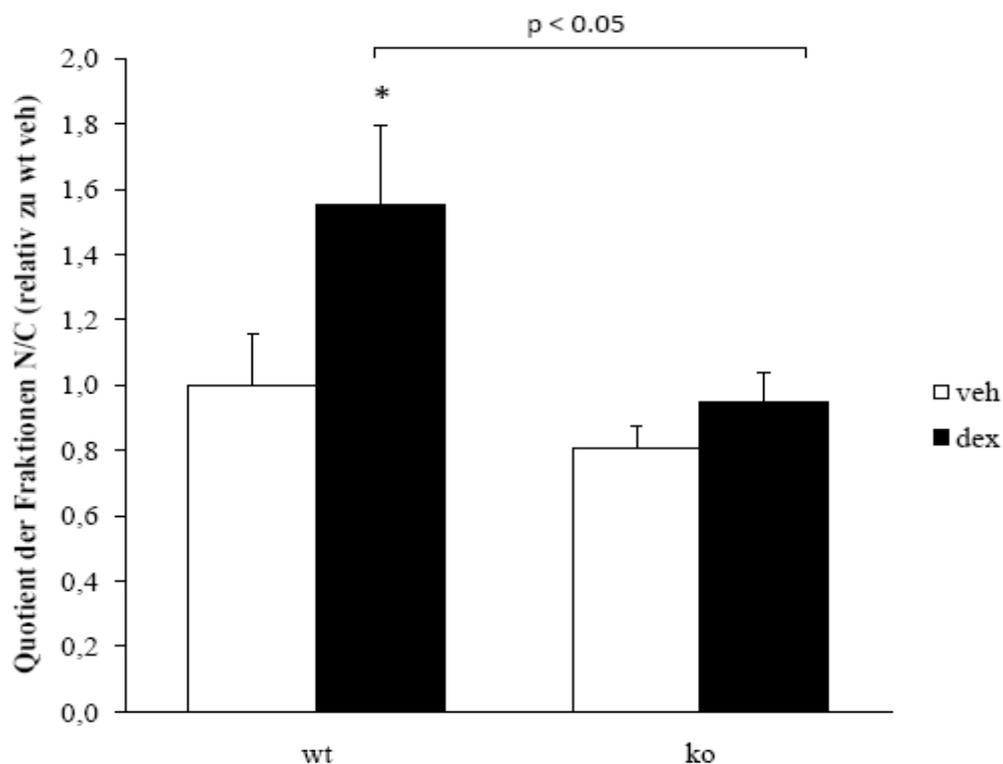


Abbildung 3.5 Densitometrische Analyse der Western Blots zur Glucocorticoidrezeptortranslokation (n=3; *p<0,05 vs wt veh)

3.3 Der HDAC6-Einfluss auf die hepatische Genexpression

Der GR vermittelt einen Großteil seiner Funktion durch die Regulation der Transkription diverser GR-Zielgene (120). Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen zur Beeinflussung der GR-Translokation durch HDAC6 in der Leber, sollte gezeigt werden, welchen Einfluss HDAC6 generell auf die hepatische Genexpression hat und ob der Einfluss auf die Translokation des GR nach Ligandenstimulation sich auf Transkriptionsebene fortsetzt. Um dies zu analysieren wurde ein Microarray auf Oligonukleotidbasis mit in cDNA umgeschriebener RNA aus den Versuchstierlebern der vier Gruppen durchgeführt.

Aus diesem Microarray ging hervor, dass es keine wesentlichen Unterschiede im Genexpressionsprofil zwischen Vehikel-behandelten Wildtyp und HDAC6 Knockout Versuchstierlebern gibt. Zwischen den Dexamethason-behandelten Gruppen zeigten sich tendenzielle Unterschiede hinsichtlich der Regulation einer Vielzahl von Genen (Tabelle 3).

Zur Bestätigung der Ergebnisse des Microarrays, wurden anschliessend qPCR Analysen von einigen bekannten GR-Zielgenen aus dem gleichen Probenmaterial durchgeführt. Wie Abbildung 3.6 zeigt, konnten sowohl für die Dual Specificity Phosphatase 1 (DUSP1, auch bekannt als MKP1=Mitogenaktivierte Protein Kinase Phosphatase-1), als auch die Serum- und Glucocorticoid Induzierte Proteinkinase 1 (SGK1) signifikante Unterschiede nachgewiesen und damit die Resultate des Microarrays bestätigt werden (n=7-8)(192-194).

Mit diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass die GR-induzierte Genexpression in Lebern von HDAC6 Knockout Mäusen signifikant schwächer ausfällt als bei ihren Wildtyp Geschwistertieren. Folglich führte die bereits nachgewiesene, eingeschränkte GR Translokation in Lebern von HDAC6 Knockout Mäusen zu einer Verminderung der transkriptionellen Aktivität des GR und HDAC6 konnte somit als Modulator der hepatischen GR-Funktion identifiziert werden.

Tabelle 3 Ein Oligonukleotid-Microarray wurde mit Leber-mRNA von n=3 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Dargestellt ist die dexamethasoninduzierte bzw. -verminderte mRNA Expression mit den stärksten Unterschieden der jeweiligen Genotypen.

X-fache Induktion durch dex in wt Mäusen	X-fache Induktion durch dex in HDAC6 ko Mäusen	Gen Symbol	Beschreibung
13,26	6,76	Dusp1	dual specificity phosphatase 1
19,11	9,79	Acot1	acyl-CoA thioesterase 1
-8,11	-4,27	Gatm	glycine amidinotransferase
13,60	7,43	Treh	trehalase (brush-border membrane glycoprotein)
-8,12	-4,48	Gnpda1	glucosamine-6-phosphate deaminase 1
8,22	4,54	Slc25a33	solute carrier family 25, member 33
9,98	5,55	Accn5	amiloride-sensitive cation channel 5, intestinal
-7,83	-4,36	Sirpa	signal-regulatory protein alpha
-8,94	-5,01	Tmie	transmembrane inner ear
8,75	4,95	Porcn	porcupine homolog (Drosophila)
-11,19	-6,46	Fnip2	folliculin interacting protein 2
-12,31	-7,19	Trim14	tripartite motif-containing 14
8,45	5,02	Skil	SKI-like
-9,61	-5,79	Dclk3	doublecortin-like kinase 3
-8,53	-5,26	Gpr146	G protein-coupled receptor 146
-8,84	-5,46	Anks4b	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 4B
-9,64	-5,97	Lima1	LIM domain and actin binding 1
7,04	4,36	5730446C15Rik	RIKEN cDNA 5730446C15 gene
-7,58	-4,80	Pola2	polymerase (DNA directed), alpha 2
-9,56	-6,13	D430015B01Rik	RIKEN cDNA D430015B01 gene
-6,70	-4,29	Plekhg6	pleckstrin homology domain containing, family G member 6
-7,20	-4,62	Notch2	Notch gene homolog 2 (Drosophila)
8,05	5,20	Slc25a25	solute carrier family 25, member 25
-6,67	-4,32	ENSMUSG00000057924	predicted gene, ENSMUSG00000057924
-7,84	-5,12	Es22	esterase 22
-6,63	-4,34	Centd2	centaurin, delta 2
-7,53	-4,94	Arrdc4	arrestin domain containing 4
-6,87	-4,53	Smad3	MAD homolog 3 (Drosophila)
-8,22	-5,50	Irf1	interferon regulatory factor 1
-7,49	-5,02	Sept9	septin 9
-9,43	-6,38	Svil	supervillin
-7,45	-5,05	Oaf	OAF homolog (Drosophila)
11,68	7,94	4930485B16Rik	RIKEN cDNA 4930485B16 gene
-8,58	-5,90	Olfml1	olfactomedin-like 1
-6,79	-4,67	EG545242	predicted gene, EG545242
8,31	5,74	Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma
6,94	4,84	Sept14	septin 14
-7,46	-5,21	Cybas3	cytochrome b, ascorbate dependent 3
-9,55	-6,68	1810031K17Rik	RIKEN cDNA 1810031K17 gene
-10,63	-7,50	Plxnd1	plexin D1

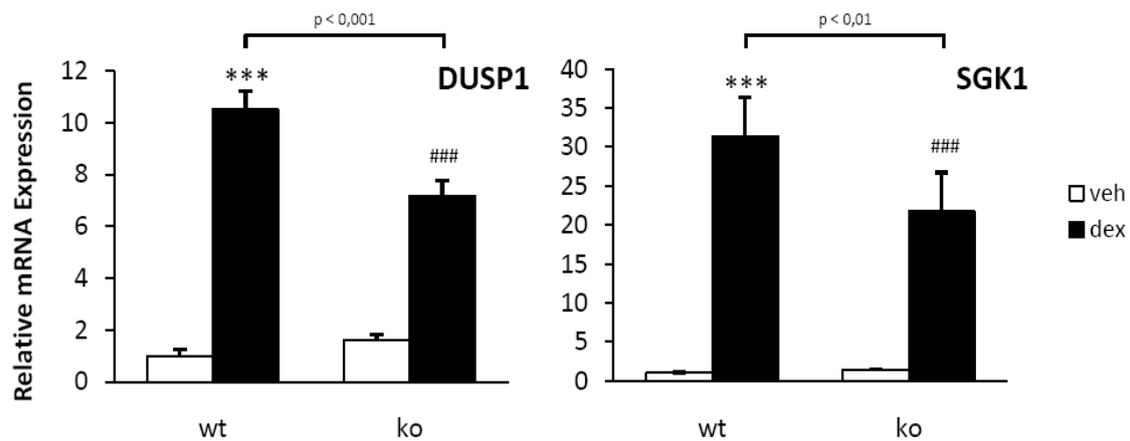


Abbildung 3.6 Bestätigung der Ergebnisse des Microarray durch Analyse der RNA Expression exemplarischer Gene mittels quantitativer real time PCR (n=7-8).

3.4 Die Rolle von HDAC6 im glucocorticoidinduzierten Glucosestoffwechsel der Leber

Da die Gluconeogenese einen wichtigen Signalweg in Hinblick auf den Glucocorticoid-regulierten Glucosestoffwechsel in der Leber darstellt und somit einen wesentlichen Beitrag zum Steroid-induzierten Diabetes leistet, wurde der weitere Fokus auf die Genexpressionsanalyse von Zielgenen gelegt, die für die hepatische Gluconeogenese funktionell wichtig sind. Diese Zielgene stellen die wesentlichen energieverbrauchenden Umgehungsschritte der irreversiblen Vorgänge in der Glykolyse dar. Zu diesen Zielgenen zählen die Pyruvatcarboxylase (PCX), Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP) sowie die Glucose 6-phosphatase (G6P). Die Genexpressionsanalyse der aus Lebergewebe der Dexamethason- sowie Vehikel-behandelten Versuchstiere ergab für alle vier Gene, dass die Dexamethasonbehandlung in den Wildtyp Mäusen zu einer signifikanten Induktion führt (siehe Abbildung 3.7). Betrachtet man die Ergebnisse der HDAC6 Knockout Mäuse ist zu erkennen, dass die analysierten Gene zwar in unterschiedlichem Maße durch Dexamethasonbehandlung induziert wurden, jedoch alle signifikant schwächer, als die entsprechend behandelten

Wildtyp Mäuse. Dabei wurde eine vollständig fehlende glucocorticoidvermittelte Induktion für die Gene G6P und FBP beobachtet, wohingegen die PEPCK- und PCX-Induktion zwar signifikant aber lediglich vermindert sind.

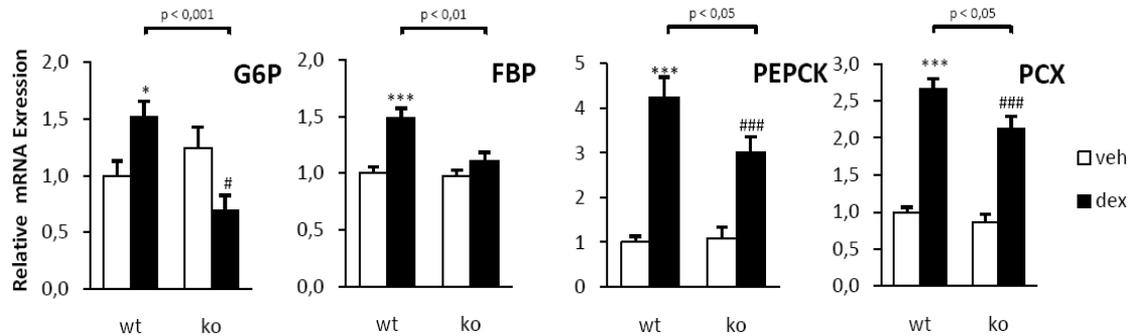


Abbildung 3.7 Genexpressionsanalyse der für die Gluconeogenese bestimmenden Gene Glucose 6-phosphatase (G6P), Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP), Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) und Pyruvatcarboxylase (PCX) in Vehikel- bzw. Dexamethason-behandelten Wildtyp- sowie HDAC6-defizienten Mäusen. Analysiert mittels quantitativer real time PCR (n=7-8).

Um mögliche posttranskriptionelle Gegenregulation auszuschließen und zu überprüfen, ob sich die RNA-Regulation auf der Protein- und Effektorebene fortsetzt, wurden exemplarisch die Proteine G6P sowie PEPCK mittels Westernblot aus Leberproteinlysaten analysiert. In Abbildung 3.8 ist ersichtlich, dass beide GR-Zielproteine durch Dexamethasonbehandlung im Wildtyp Versuchstier eine stark induzierte Expression aufwiesen, was den zuvor ermittelten RNA Daten entsprach. Des Weiteren war ersichtlich, dass, wie auch auf RNA Ebene, die Regulation der Zielproteine durch Dexamethason in HDAC6 Knockout Mäusen nicht so ausgeprägt stattfand, wie in den entsprechenden Wildtyp Mäusen. Man kann also schlussfolgern, dass die in HDAC6 Knockout Mäusen beeinträchtigte, Glucocorticoid-induzierte GR-Translokation zu einer verminderten Transkription der gluconeogenesespezifischen GR-Zielgene und auch Translation der entsprechenden Proteine führt.

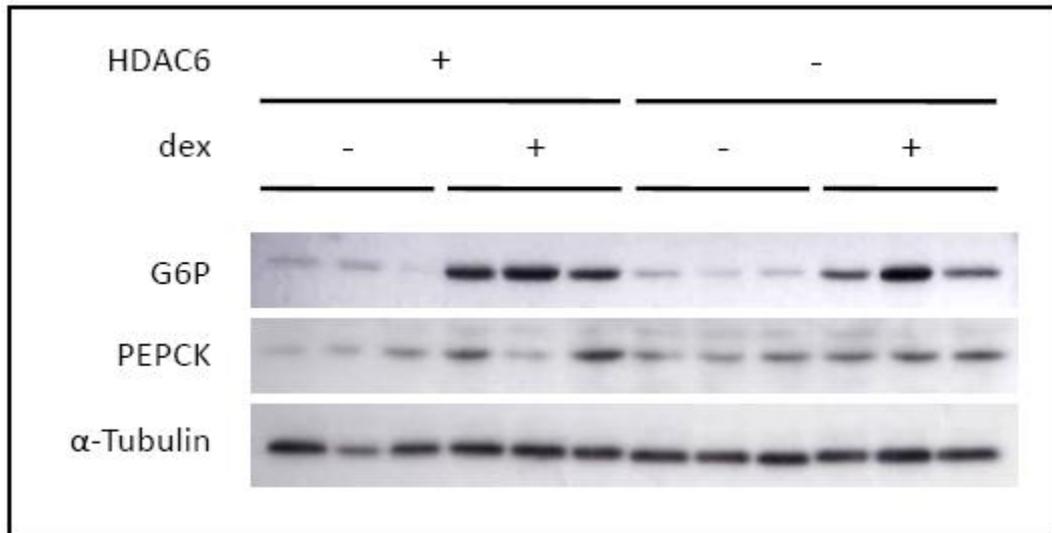


Abbildung 3.8 Western Blot der für die Gluconeogenese maßgeblich bestimmenden Proteine Glucose 6-phosphatase (G6P) und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) aus dem Leberproteinlysat der Versuchstiere (HDAC6 + entspricht Wildtyp Mäusen, HDAC6 - entspricht HDAC6-defizienten Mäusen)

Um diese Ergebnisse auf pharmakologischer Ebene zu erweitern, wurden HDAC-Inhibitoren in Zellkulturexperimenten mit der H4IIE Zelllinie eingesetzt. Diese Rattenleberzellen, sind sehr gut hinsichtlich ihres Ansprechens auf Dexamethason charakterisiert und wurden daher für die Versuche ausgewählt.

Nach Stimulation der Zellen mit Vehikel (DMSO), einem unselektiven HDAC-Inhibitor (TSA 1 μ M), sowie einem selektiven HDAC6-Inhibitor (Tubacin 20 μ M), erhielten die Zellen 500nM Dexamethason bzw. 70% Ethanol (Vehikel).

Wiederrum wurden die Gene G6P und PEPCK mittels qPCR analysiert, mit dem Ergebnis, dass nach vierstündiger Glucocorticoidstimulation eine Induktion auf über 200% für G6P und über 500% für PEPCK verglichen mit Vehikel beobachtet werden konnten (siehe Abbildung 3.9). Die Daten demonstrieren, dass pharmakologische Inhibition von HDAC6 mit selektiven, aber auch unselektiven Inhibitoren, ebenso wie ein Ganzkörperknockout, zu einer verminderten Dexamethason-induzierten Zielgenregulation führt.

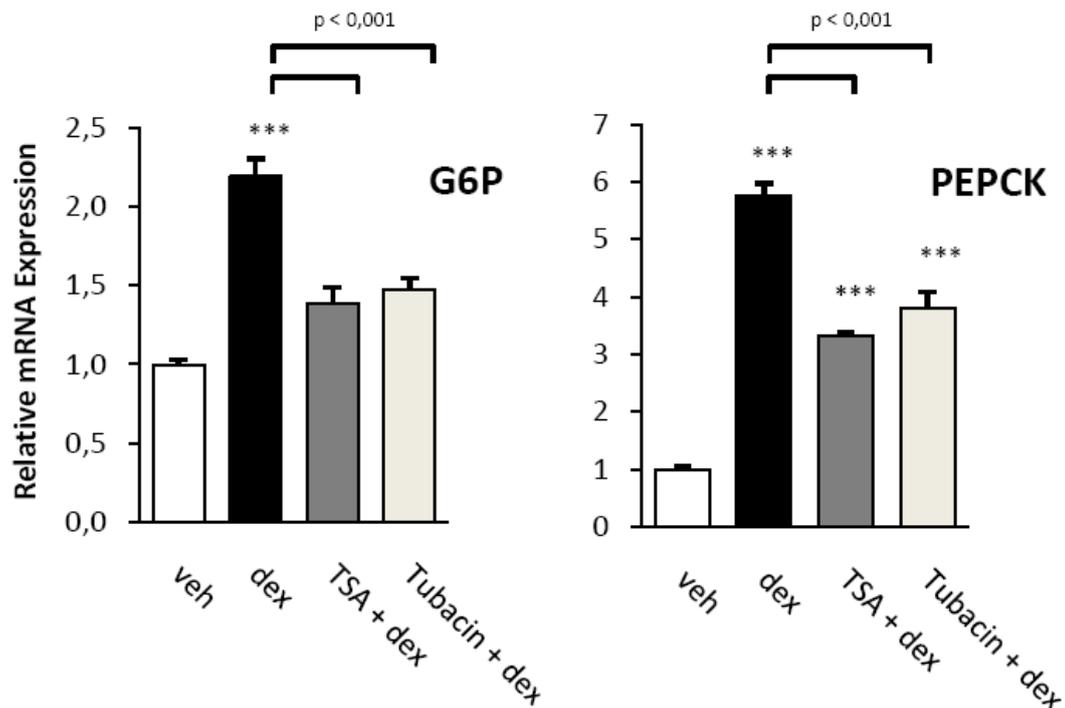


Abbildung 3.9 H4IIE-Rattenleberzellen wurden 30 Minuten mit DMSO (Vehikel), dem unselektiven HDAC-Inhibitor TSA (1 μ M) oder dem selektiven HDAC6-Inhibitor Tubacin (20 μ M) behandelt bevor eine vierstündige Dexamethasonstimulation (500nM) der Zellen stattfand. Mittels real time PCR wurde anschließend die Genexpressionsregulation der Gene G6P und PEPCK analysiert. Das Experiment wurde drei Mal in dreifacher Ausführung durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Um zu beurteilen, ob sich die inhibitorische Wirkung von HDAC6 auf die Dexamethasonzielgen- und -proteinexpression auch entsprechend auf den Glucocorticoid-induzierten Leberglycolyestoffwechsel auswirkt, wurde im nächsten Schritt die Glucoseproduktion analysiert. Für dieses Experiment wurden Wildtyp und HDAC6 Knockout Hepatozyten aus den entsprechenden Mäusen isoliert und diese nach Dexamethasonstimulation in glucosefreiem Medium kultiviert (siehe Material und Methoden). Die analysierte Menge Glucose im Medium normalisiert auf den Gesamtproteingehalt der entsprechenden Zellen ergab, dass die dexamethasoninduzierte Glucoseproduktion in Wildtyp Hepatozyten auf fast das doppelte Anstieg (siehe Abbildung 3.10). Im Kontrast dazu konnte zwar in den HDAC6 Knockout Hepatozyten ein tendenzieller Anstieg der Glucoseproduktion beobachtet

werden, jedoch in signifikant schwächerem Ausmaß als in den Wildtyp Vergleichsleberzellen.

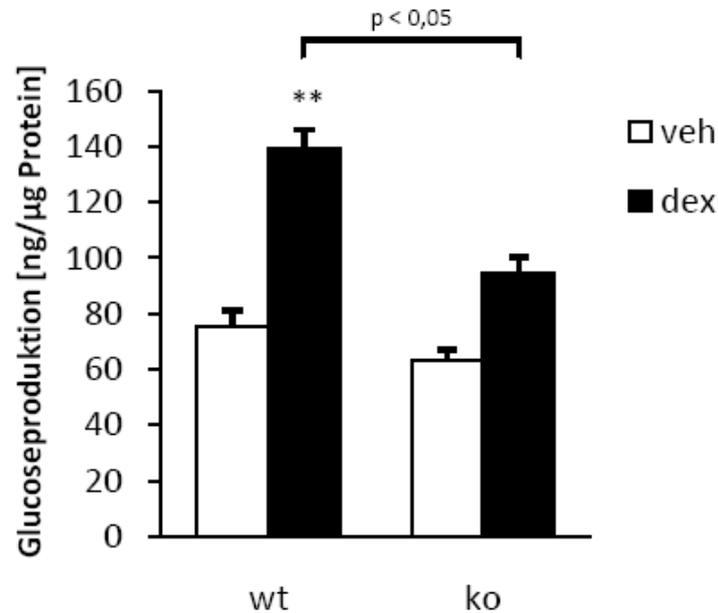


Abbildung 3.10 Darstellung der Unterschiede der glucocorticoidstimulierten Glucoseproduktion zwischen primären Wildtyp- und HDAC6 Knockout – Hepatozyten. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Dexamethason (500nM) bzw. Vehikel behandelt. Nach 20 Stunden Behandlung wurden die Zellen gewaschen und für die finalen vier Stunden in glucosereiem Medium kultiviert (siehe Material und Methoden) und anschließend der Glucosegehalt des Mediums normalisiert auf den Gesamtproteingehalt des betreffenden Lochs.

Es kann also zusammengefasst werden, dass Verlust der HDAC6 Funktion in Leberzellen zu einer verminderten hepatischen Glucocorticoidzielgen- und – proteinexpression führt, welche wiederum in einer verminderten Glucoseproduktion der Leberzelle resultiert.

3.5 HDAC6-Einfluss auf glucocorticoid-induzierte diabetogene Effekte

Besitzt HDAC6 das Potential glucocorticoidinduzierte Insulinresistenz und Glucoseintoleranz zu verbessern?

Um diese Frage zu beantworten, wurden Wildtyp und HDAC6 Knockout Mäuse nachdem sie zunächst drei Wochen mit Dexamethason (1mg/kg KG) bzw. Vehikel behandelt wurden metabolisch phänotypisiert. Hierfür wurden intraperitonealer (ip) Glucose- sowie Insulintoleranztest durchgeführt und die Tiere in Stoffwechsellkäfigen untersucht.

3.5.1 Labmaster

Nach dreiwöchiger Behandlung der Tiere, wurden sie mittels LabMaster Stoffwechsellkäfigen hinsichtlich Futter- und Wasseraufnahme, sowie lokomotorischer Aktivität und des primär verstoffwechselten Substrates charakterisiert. Durch die Messung der Respiratory Exchange Ratio (RER) über 24 Stunden lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob vorwiegend Kohlenhydrate, Fett oder Protein zur Deckung des Energiebedarfs vom Körper herangezogen werden. Typisch für den RER sind höhere Werte in körperlich aktiven Phasen, da hier vermehrt Kohlenhydrate abgebaut werden, die einen Respiratorischen Quotienten (RQ) von 1,0 aufweisen. In inaktiven Phasen werden anteilig weniger Kohlehydrate verbrannt und der RER liegt bei niedrigeren Werten, da Fett (RQ=0,7) und Proteine (RQ=0,81) einen größeren Anteil ausmachen. Die Ergebnisse der Betrachtung der Versuchstiere über 24 Stunden führten zu der Erkenntnis, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und HDAC6-defizienten Mäusen bezüglich des RER vorlagen, und dementsprechend auch von keiner Utilisation unterschiedlicher Anteile der Stoffwechselsubstrate ausgegangen werden kann (siehe Abbildung 3.11). Auch die Analyse der Nahrungsaufnahme ergab keine

Unterschiede zwischen den vier Gruppen was Wasser- und Futteraufnahme anging (siehe Tabelle 4).

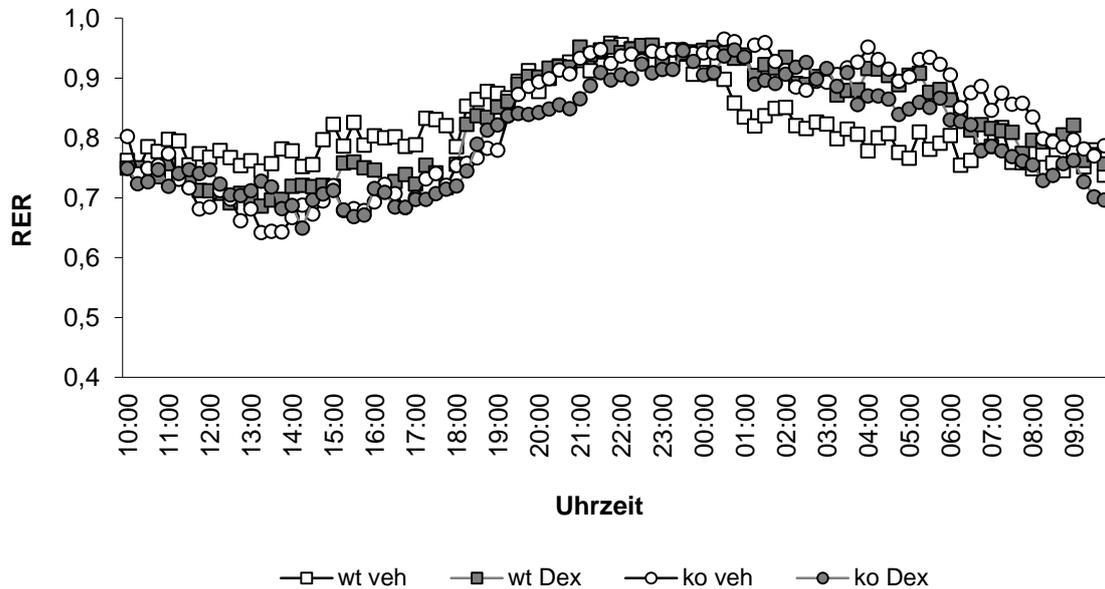


Abbildung 3.11 Respiratory Exchange Ratio (RER) gemessen in jeweils n=7 Tieren pro Gruppe für jeweils 24 Stunden pro Tier. Der RER errechnet sich aus dem Quotienten der Sauerstoffaufnahme und die Kohlenstoffdioxidabgabe des Körpers und ist liefert somit eine Aussage über das primär utilized Substrat zur Energiegewinnung.

Durch die im Labmaster verbauten Lichtschranken in x, y, und z Ebene war es möglich, die lokomotorische Aktivität der Tiere zu messen, aber auch hier stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen heraus.

Tabelle 4 Auswertung der Labmasterparameter zur Charakterisierung des Stoffwechsels

HDAC6	Wildtyp		Knockout	
Dexamethason	-	+	-	+
RER	0,832 ± 0,013	0,830 ± 0,012	0,827 ± 0,010	0,811 ± 0,015
Lokomotorische Aktivität [Zähler/24h]	89982 ± 7084	86666 ± 4767	84232 ± 8479	93987 ± 5619
Wasseraufnahme [ml/24h]	4,29 ± 0,51	4,51 ± 0,21	4,75 ± 0,48	5,07 ± 0,90
Futteraufnahme [mg/24h]	3,55 ± 0,37	3,71 ± 0,17	3,84 ± 0,23	3,29 ± 0,30

3.5.2 Gewichtsentwicklung

Über den gesamten Behandlungszeitraum wurde das Gewicht der Tiere überprüft und zur Auswertung das Gewicht zu Beginn und relativ dazu das Gewicht am Ende der Behandlung herangezogen (siehe Abbildung 3.12). Dabei stellte sich heraus, dass die Dexamethasonbehandlung tendenziell zu einer Gewichtsabnahme bzw. einer geringeren Gewichtszunahme gegenüber den entsprechenden Vehikel-behandelten Gruppen führte, der einzige signifikante Unterschied war zwischen den unterschiedlichen Dexamethason-behandelten Genotypen zu verzeichnen.

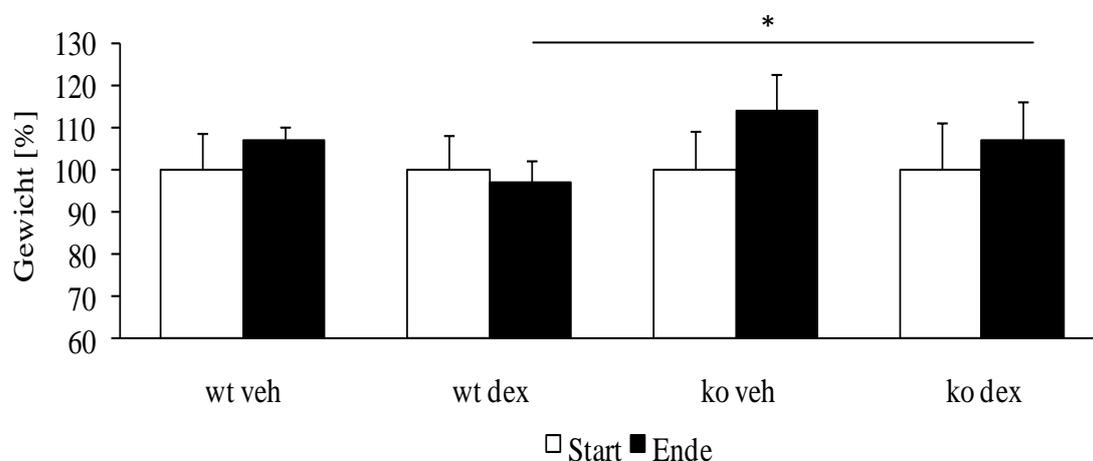


Abbildung 3.12 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere über den gesamten Behandlungszeitraum (*p < 0,05 Dexamethason-behandelte Wildtypen vs Dexamethason-behandelte HDAC6 Knockout Mäuse n=5)

3.5.3 Nüchternblutglucose und Glucosetoleranz

Wie in Abbildung 3.13 zu erkennen zeigten die Wildtyp Mäuse nach dreiwöchiger Dexamethasonbehandlung signifikant erhöhte Nüchternblutglucosewerte. Im Gegensatz dazu wiesen die genüchternen HDAC6-defizienten Mäuse keine signifikant erhöhte Blutglucosekonzentration auf.

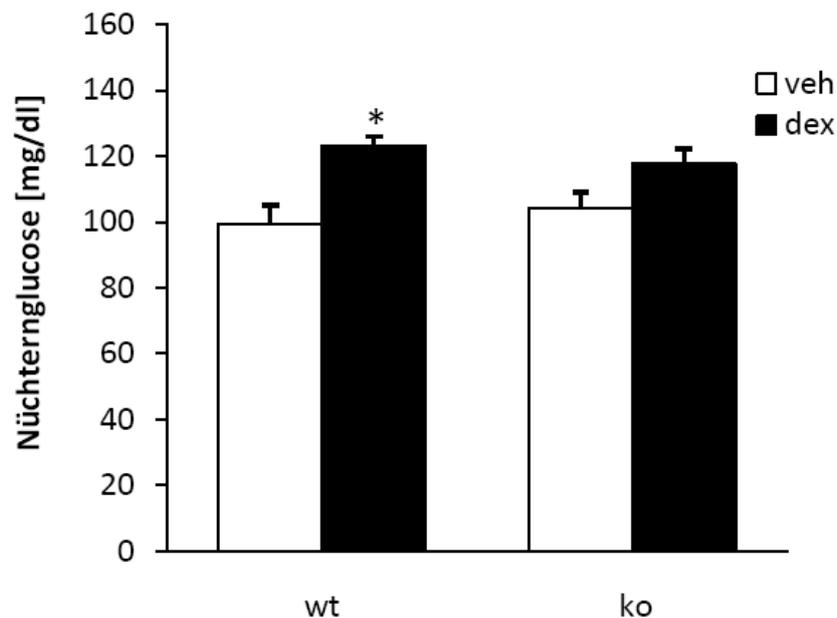


Abbildung 3.13 Nach einer 14-stündigen Fastenperiode wurde den bereits drei Wochen behandelten Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und die Nüchternblutglucose quantifiziert (n=5-9).

Des Weiteren resultierte die Dexamethasonbehandlung in einer Glucoseintoleranz der Wildtyp Mäuse, welche anhand des GTT festgestellt wurde. Signifikante Werte wurden nur an vereinzelten Zeitpunkten erreicht, jedoch erkennt man insgesamt mittels Auswertung der Fläche unter der Glucoseverlaufskurve (AUC) die signifikante Entwicklung der Dexamethason-induzierten Glucoseintoleranz in den Wildtyp Mäusen (siehe Abbildung 3.14). Im Gegensatz dazu konnte in den Dexamethason-behandelten verglichen mit den Vehikel-behandelten HDAC6-defizienten Tieren kein Unterschied in der Glucosetoleranz detektiert werden. Es war sogar eine signifikante Verbesserung

der Glucoseverlaufskurve ab einem Zeitpunkt von 60 Minuten zu beobachten. Insgesamt war die Glucosetoleranz der Glucocorticoid-behandelten HDAC6 Knockout Mäuse hochsignifikant besser als die der Wildtyp Kontrollgruppe.

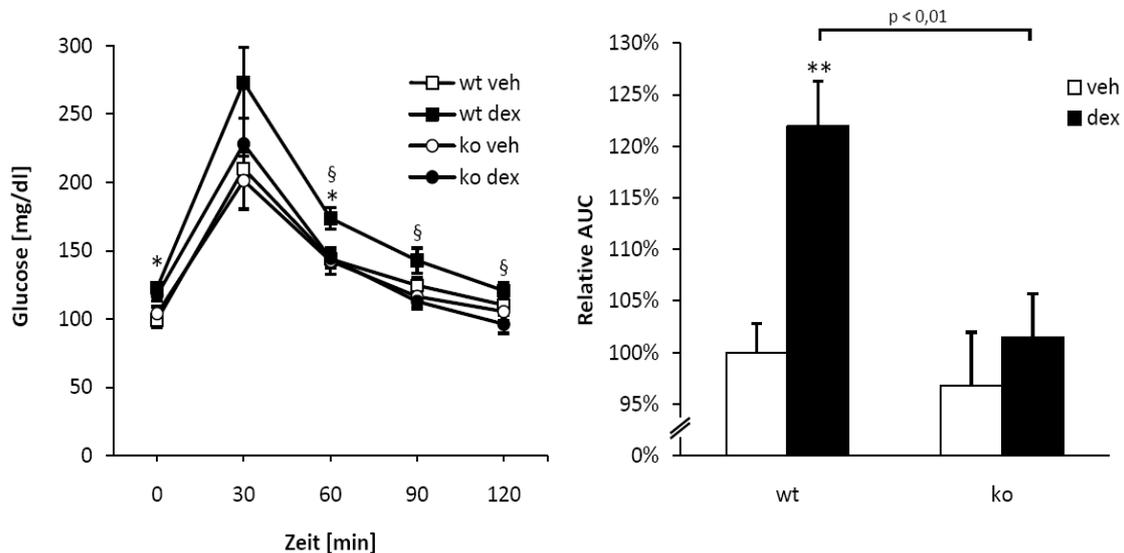


Abbildung 3.14 Nach 14-stündigem Fasten wurde den Versuchstieren Glucose injiziert und anschließend nach prädefinierten Zeitpunkten die Blutglucose über Blutentnahme aus der Schwanzvene bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse dieses Glucosetoleranztests als Glucoseverlaufskurven der einzelnen Gruppen sowie zur vereinfachten Darstellung als Balkendiagramm der Fläche unter der Glucoseverlaufskurve (AUC; n=5-9; *p<0,05 **p<0,01 wt dex vs wt veh; §p<0,05 wt dex vs ko dex).

3.5.4 Seruminsulin und Serumcorticoosteron

Um die Möglichkeit einer durch Dexamethason induzierten Insulinsekretionsstörung und eine folgende Beeinträchtigung der Glucoseaufnahme aus dem Blut auszuschließen wurden die Seruminsulinspiegel der Versuchstiere mittels ELISA untersucht.

In Wildtyp Mäusen konnten, bedingt durch chronische Glucocorticoidapplikation, fünffach erhöhte Seruminsulinkonzentrationen gemessen werden (siehe Abbildung 3.15).

Betrachtet man die Werte der HDAC6 Knockout Mäuse, sieht man unabhängig von der Behandlung keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Vehikel-behandelten Wildtyp Versuchstiergruppe. Bemerkenswert ist jedoch die durch HDAC6-Defizienz bedingte, hochsignifikante Verbesserung der dexamethasoninduzierten Hyperinsulinämie.

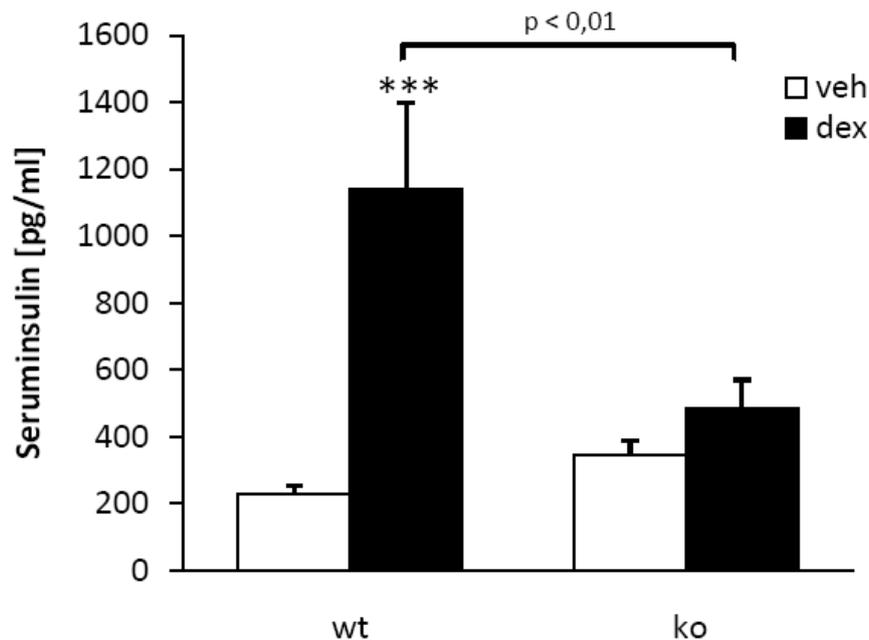


Abbildung 3.15 Den Mäusen wurde final Blut entnommen und daraus Serum isoliert. Mittels ELISA wurde die Seruminsulinkonzentration bestimmt (n=5-9).

Um das Ansprechen der Tiere auf die Dexamethasonbehandlung zu untersuchen und einen Hinweis auf eine eventuelle Beeinträchtigung des hypophysär-hypothalämischen negativen Feedbackmechanismus zu bekommen beziehungsweise um Effekte endogener Glucocorticoide beurteilen zu können, wurde die Serumcorticosteronkonzentration mittels Radioimmunoassay bestimmt.

Die Analyse ergab für die Dexamethason-behandelten Gruppen Werte unter der Detektionsgrenze von 7,7 ng/ml (siehe Abbildung 3.16), weshalb eine vollständige Auswertung nicht möglich war. Anhand der niedrigen endogenen

Corticosteronkonzentrationen lässt sich jedoch schlussfolgern, dass sowohl Wildtyp als auch HDAC6-defiziente Mäuse auf die Behandlung angesprochen haben und der negative Feedbackmechanismus in beiden Genotypen funktioniert hat. In den Vehikel-behandelten Kontrollgruppen ergab sich eine Tendenz zu gesteigerten endogenen Serumcorticosteronwerten in HDAC6-defizienten im Vergleich zu Wildtypmäusen. Es lag jedoch kein signifikanter Unterschied vor.

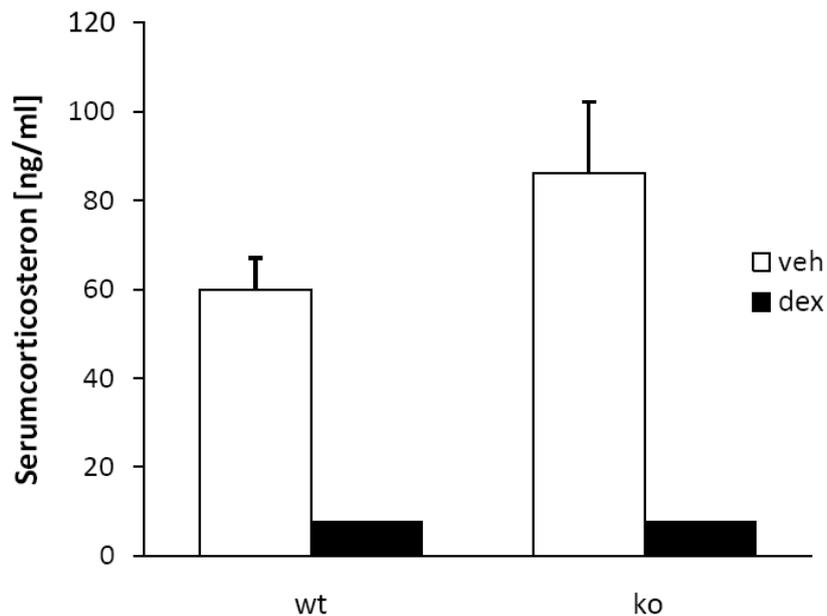


Abbildung 3.16 Aus final gewonnenem Serum der Versuchstiere wurde mittels Radioimmunoassay die Corticosteronkonzentration bestimmt. Die Balken der Dexamethason-behandelten Gruppen sind beispielhaft als Wert 7,7 ng/ml ohne Standardabweichungen dargestellt, da dieser Wert die Detektionsgrenze des Assays darstellte und die gemessenen Werte der Gruppen darunter lagen (n=5-9).

3.5.5 Insulinsensitivität

Anhand der Glucoseverlaufskurve des Insulin-toleranztests (siehe Abbildung 3.17 links) und der Darstellung der relativen Insulinsensitivität in Abbildung 3.17 rechts ist ersichtlich, dass es bei Wildtyp Mäusen zu einer hochsignifikanten Glucocorticoid-vermittelten Verschlechterung der Insulinsensitivität kam. Vergleicht man die HDAC6

Knockout Mäuse miteinander, war keine signifikante Veränderung der Insulinsensitivität trotz Dexamethasonbehandlung zu vermerken.

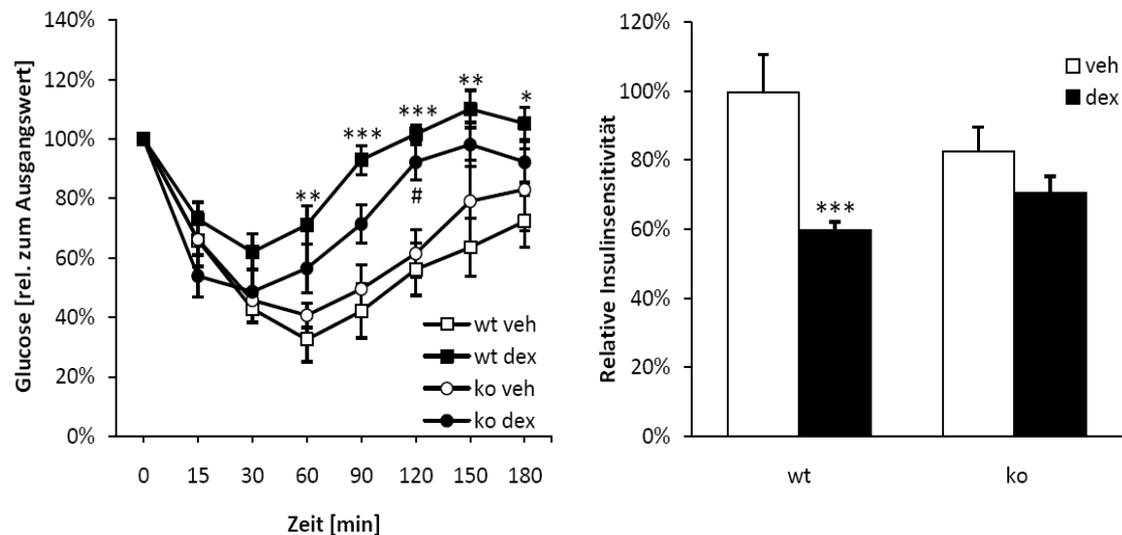


Abbildung 3.17 Ein Insulintoleranztest wurde nach 4 Stunden Futterentzug in behandelten bzw. unbehandelten Wildtyp- und Knockout-Mäusen durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten, bezogen auf die Insulininjektion (0,5U/kg KG), wurden die Blutglucosewerte analog zum GTT bestimmt. Die Darstellung erfolgt hier als Glucoseverlaufskurve (links) sowie zur vereinfachten Interpretation als reziproke Fläche unter der Verlaufskurve (AUC Insulinsensitivität, rechts)(***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05 vs Vehikel-behandelte Wildtypen #p < 0,05 vs Vehikel-behandelte HDAC6 Knockout Mäuse; n=5).

Um die periphere Insulinsensitivität weiter zu untersuchen wurden das Fettgewebe sowie die Skelettmuskulatur untersucht. Im Fettgewebe wurde die Expression des IRS1 Gens analysiert, welches bekanntermaßen während einer Insulinresistenz schwächer exprimiert ist. In

Abbildung 3.18 dargestellt, konnte durch Dexamethasonbehandlung eine Reduktion der IRS1-mRNA Expression auf das 0,7-fache im Vergleich zu den Wildtyptieren beobachtet werden. Diese Veränderung war jedoch nur tendenziell und wies keine Signifikanz auf. Die basale IRS1-Genexpression im HDAC6-defizienten Tier ist bereits etwas höher als im Wildtyptier, wurde durch Dexamethasonbehandlung auch

herabreguliert, jedoch ebenfalls nur tendenziell und nur bis auf das Niveau der Vehikel-behandelten Wildtyptiere.

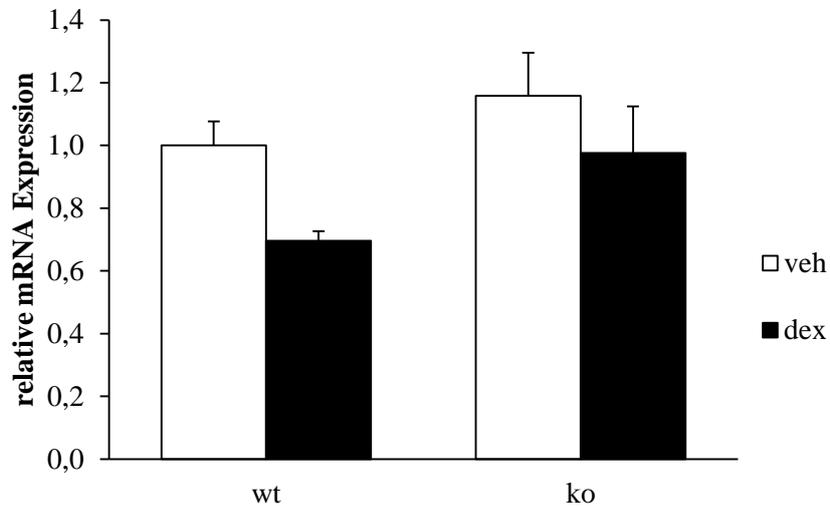


Abbildung 3.18 IRS-1 Genexpression im gonadalen Fettgewebe ($n \geq 5$).

Im Skelettmuskel ist das Verhältnis von phospho-(Ser473)-AKT zu AKT ein Indikator für die Insulinsensitivität. Die Analyse der Proteinexpression mittels densitometrischer Auswertung der Banden ergab nach Normalisierung der Proteine auf das Housekeeping-Protein GAPDH eine signifikante Verringerung des p-AKT/ AKT Quotienten durch die Dexamethasonbehandlung im Wildtyp, was mit der Insulinresistenz konsistent ist. In den HDAC6 Knockout Tieren war dieser Effekt nicht zu beobachten. Es war jedoch ein signifikant höherer Quotient in den Dexamethason-behandelten Knockout-Tieren im Vergleich zu den gleichbehandelten Wildtypieren festzustellen (siehe Abbildung 3.19).

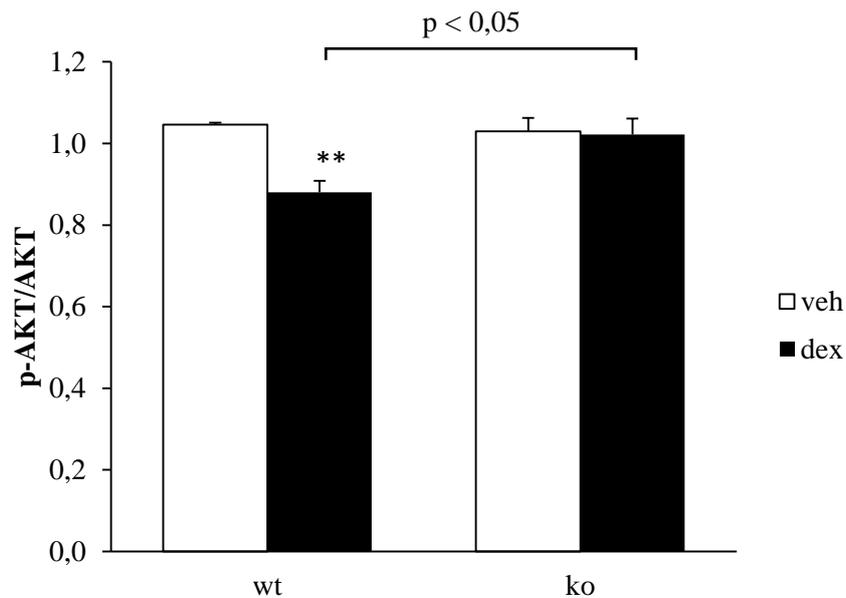


Abbildung 3.19 Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung des Verhältnisses der Expression von phospho-AKT zu AKT normalisiert auf GAPDH (** $p < 0,01$ vs Vehikel-behandelte Wildtyp Mäuse; $n=3$).

Zusammenfassend wurde mit den dargestellten Ergebnissen gezeigt, dass HDAC6 Defizienz, zumindest teilweise, in einer Verbesserung der Glucocorticoid-induzierten Hyperglykämie, -insulinämie, Glucoseintoleranz und Insulinresistenz resultiert.

3.6 Anti-inflammatorische Effekte von Dexamethason bei HDAC6-Defizienz

Eine Verbesserung des Nutzen-Risiko-Profiles der Glucocorticoide ist sicherlich durch Verminderung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu erreichen, jedoch nur unter der Bedingung, dass der Nutzen, also die erwünschten Arzneimittelwirkungen unverändert vorliegen oder gar verbessert sind. Um dies zu evaluieren wurden Marker analysiert, die Rückschlüsse auf die anti-inflammatorischen Wirkungen der Glucocorticoide ziehen lassen.

3.6.1 *Genexpression in peripheren mononukleären Zellen*

Um einen ersten Anhaltspunkt für die anti-inflammatorische Wirksamkeit Dexamethasons in Wildtyp und HDAC6 Knockout Mäusen zu gewinnen, wurden aus dem Vollblut der Versuchstiere periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) isoliert. Aus diesen wurde RNA isoliert und anschließend ein Marker der Inflammation mittels qPCR analysiert. Aufgrund der geringen Menge Blut, welches man aus einer Maus gewinnen kann, wurde das Blut aller Mäuse (n=5) einer jeweiligen Gruppe gepoolt und daraus anschließend die mRNA der PBMCs gewonnen. Dementsprechend ergab sich nur eine Stichprobenzahl von n=1 aus je 5 Tieren und es ist keine statistische Auswertung möglich gewesen.

Aufgrund der geringen RNA Menge wurde das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β exemplarisch bestimmt (siehe Abbildung 3.20).

Die Analyse ergab, dass trotz fehlender Funktion von HDAC6 weiterhin ein anti-inflammatorischer Effekt des Dexamethasons erkennbar ist, da die Expression des inflammatorischen Markers IL-1 β in HDAC6-defizienten Tieren durch Dexamethason-Behandlung in ähnlichem Ausmaß verringert ist, wie in den Wildtyp Mäusen.

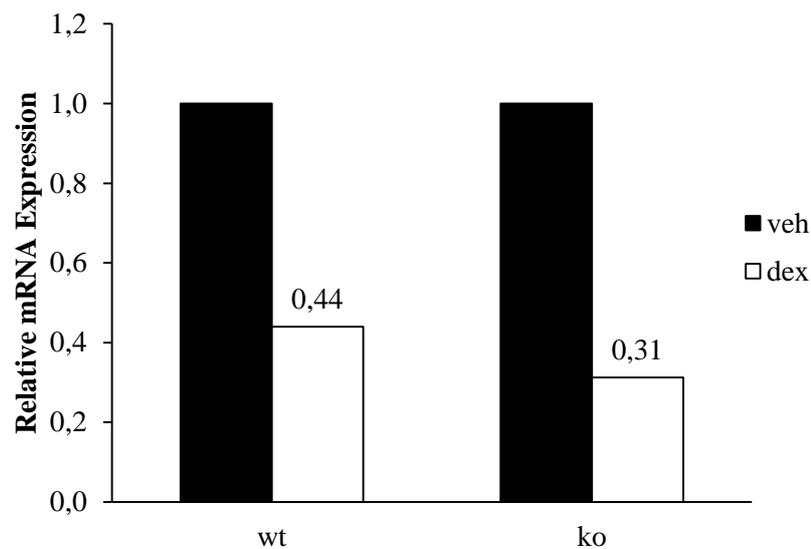


Abbildung 3.20 Relative IL-1 β mRNA Expression in PBMC.

Periphere mononukleäre Zellen wurden aus Dexamethason- (dex) sowie Vehikel-behandelten (veh) Wildtyp (wt) und HDAC6-defizienten (ko) Mäusen isoliert, gepoolt (n=5) und RNA isoliert. Als Housekeeping Gene wurde β -Actin gemessen und um den Effekt Dexamethasons zu veranschaulichen die Vehikel-behandelten Gruppen jeweils gleich eins gesetzt.

3.6.2 Inflammationsmarker im Serum

Um die anti-inflammatorische Potenz Dexamethasons bei HDAC6-Defizienz genauer zu charakterisieren wurden die Serumproteinkonzentrationen der inflammatorischen Marker IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α mittels Bio-Plex Pro Assay gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 dargestellt und zeigten keine signifikanten Unterschiede.

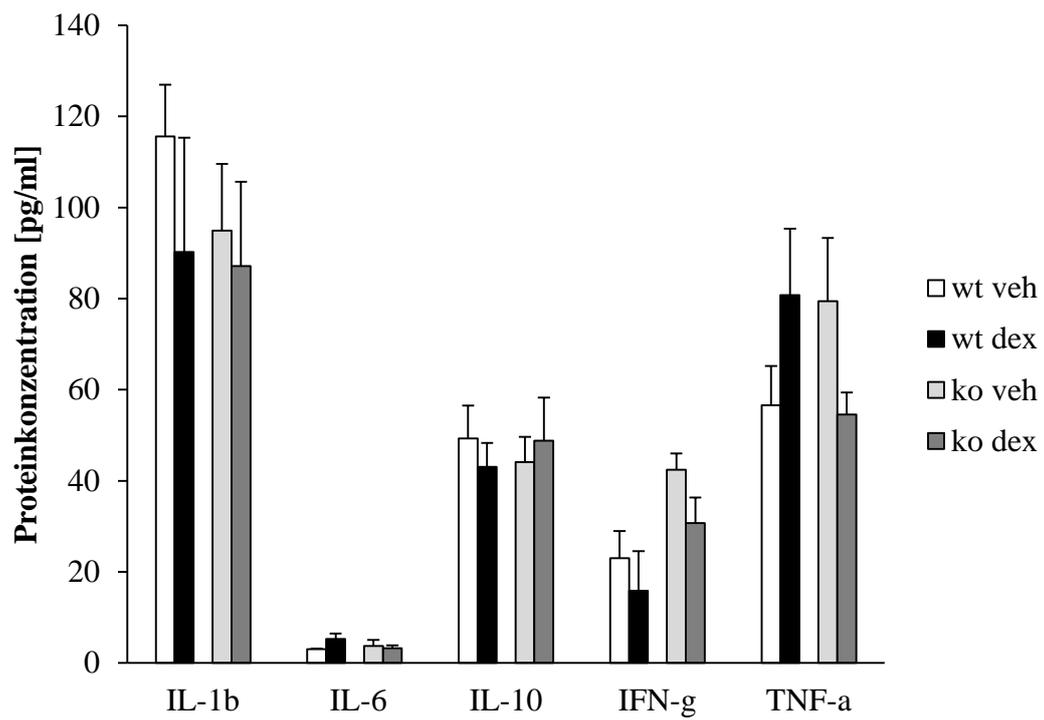


Abbildung 3.21 Serumproteinkonzentrationen der Inflammationsmarker IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α bestimmt mittels Bio-Plex Pro Assay (n=3-5).

4 DISKUSSION

4.1 Hepatische Corticosteroid-induzierte nukleäre GR-Translokation und Gentranskriptionsregulation

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte auf funktioneller Ebene erstmals gezeigt werden, dass HDAC6 in vivo für die Liganden-induzierte hepatische nukleäre Translokation des GR wichtig ist. Zusätzlich ist HDAC6 notwendig für eine vollständige Glucocorticoid-vermittelte Zellantwort im Hinblick auf die hepatische Genexpression. Die Folge der eingeschränkten Gen- und auch Proteinexpression wurde anhand der analysierten Glucoseproduktion primärer Hepatozyten aufgezeigt, welche wesentlich zur Ausbildung mehrerer Faktoren des Corticosteroid-induzierten Diabetes beiträgt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Einfluss der HDAC6-Defizienz auf die hepatische Genexpression mittels Einsatz des selektiven HDAC6-Inhibitors Tubacin reproduzierbar ist und somit eine potentielle pharmakologische Interventionsmöglichkeit hinsichtlich der Entstehung des Steroiddiabetes vorhanden ist.

Den Einfluss von HDAC6 auf die Ausbildung und Funktionalität des GR-HSP90 Komplexes und die folgende Beeinflussung der Ligandenbindungsaffinität und Translokation wurde zuvor bereits in MEFs, als auch in vitro in 293T und A549Zellen gezeigt (34,178). Im Gegensatz zu den in vitro Experimenten zeigte sich in den hier durchgeführten in vivo Versuchen keine vollständige Aufhebung der Liganden-induzierten nukleären Translokation des GR, sondern eine Abschwächung. Ein Teil des Glucocorticoidrezeptors translozierte weiterhin, weshalb eine vollständige Aufhebung der GR-vermittelten Effekte auch unwahrscheinlich erscheint. Dass die Translokation nicht vollständig inhibiert wird, lässt sich möglicherweise durch die Präsenz einer weiteren HSP90-Deacetylase erklären, denn in ursprünglichen Experimenten mit dem

unspezifischen HDAC-Inhibitor FK228, der jedoch nicht HDAC6 inhibiert, wurde ebenfalls hyperacetyliertes HSP90 gezeigt (68). Außerdem haben Murphy und Kollegen gezeigt, dass auch in HDAC6 Knockdown Zellen immer noch HSP90 mit hoher ATP-Bindungsaffinität und folglich der Fähigkeit kompetente HSP90-GR-Komplexe auszubilden vorhanden ist und somit ist es durchaus denkbar, dass HSP90 durch einen kompensatorischen Mechanismus oder eine weitere HSP90-Deacetylase weiterhin zu einem gewissen Teil in deacetylierter Form in Hepatozyten vorliegt und die Reifung des GR unterstützen kann. Eine weitere Erklärung für die verbleibende Translokation ist die Tatsache, dass die Bindungsaffinität für Corticosteroide zwar durch HSP90-Hyperacetylierung herabgesetzt, jedoch nicht aufgehoben ist (177).

Die Experimente wurden mit Tieren bzw. primären Hepatozyten aus Tieren durchgeführt, die von Geburt an kein HDAC6 exprimierten. Es ist daher vorstellbar, dass sich ein kompensatorischer Mechanismus ausbildet, der zu einer verbleibenden GR-Funktionalität führt. Um dies auszuschließen, bedarf es weiterer Studien, mit entweder einem Leberspezifischen konditionellen HDAC6-Knockoutmodell oder dem in vivo Einsatz von selektiven HDAC6-Inhibitoren.

Durch die lediglich eingeschränkte Translokation des GR lässt sich auch erklären, warum der Unterschied in der Genregulation durch Dexamethason in den verschiedenen Genotypen nicht stärker ausgefallen ist. Die verbleibende Translokationsfähigkeit und die starke Variabilität der Genregulation zwischen den Tieren der einzelnen Gruppen bei sehr geringer Stichprobenzahl im Microarray führten zu insignifikanten Ergebnissen, jedoch unterstützen sie die Hypothese, da die GR-vermittelten Effekte auf transkriptioneller Ebene tendenziell eingeschränkt sind. Die konfirmatorische Betrachtung GR-spezifischer Zielgene mittels qPCR ergab anschließend, dass signifikante Unterschiede in der Corticosteroid-induzierten Regulation zwischen Wildtyp und HDAC6-defizienten Tieren vorhanden sind.

Obwohl HDACs allgemein dafür bekannt sind, die Gentranskription durch die Deacetylierung von Histonlysinresten zu beeinflussen, wurde nicht erwartet und durch den Microarray auch bestätigt, dass HDAC6 als vorwiegend zytoplasmatische HDAC einen wesentlichen direkten Effekt auf die Genregulation hat. Jedoch ist HDAC6 nicht ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert. Kürzlich berichtete eine Studie, dass der Transkriptionsfaktor Runx2/Cbfa1 mit HDAC6 interagiert und die Deacetylase in den Zellkern von Osteoblasten rekrutiert, wo er die p21 Gentranskription reguliert (195). Obwohl diese Studie lediglich eine nukleäre Funktion der HDAC6 als transkriptioneller Regulator für einen osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktor beschreibt, so ist doch bekannt dass HDAC6 unter bestimmten Umständen nukleär vorhanden ist, somit eine direkte oder indirekte Funktion als transkriptioneller Regulator hier nicht ausgeschlossen werden kann und folglich weitere Untersuchungen hinsichtlich der nukleären Funktion von HDAC6 erforderlich sind.

Dazu gehört mitunter auch die mögliche Interaktion mit Glucocorticoid response units (GRUs), denn wie mit dem Microarray gezeigt werden konnte, wirkt sich der Effekt von HDAC6 auf die Regulation diverser GR-Zielgene quantitativ sehr unterschiedlich aus. Wie die Genexpressionsanalysen und auch andere Studien belegen, kann dies auf die genspezifische Empfindlichkeit für den Dexamethasonstimulus zurückzuführen sein (196). So wäre es denkbar, dass HDAC6 mit Transkriptionskofaktoren wie z.B. dem hepatozyte nuclear factor 4 oder dem retinoid X receptor α interagiert und somit die Interaktion von Transkriptionsfaktor und Zielpromotorregion beeinflusst (197–199). Der Einfluss von HDAC6 auf die unterschiedlichen Multiproteinkomplexe, die die promotorspezifische Empfindlichkeit gegenüber dem GR regulieren sollte entsprechend in weiteren Studien erforscht werden.

4.2 Tubacin

Die Ergebnisse der in H4IIE Rattenhepatomzellen durchgeführten Experimente mit Tubacin zeigen, dass aus spezifischer HDAC6-Inhibition eine signifikante Reduktion der Dexamethason-induzierten Genexpression für die Gluconeogenese relevanter Gene resultiert.

Ursprünglich wurde Tubacin als Inhibitor charakterisiert, der lediglich die Tubulindeacetylase Domäne von HDAC6 blockiert (58). Die Inhibition der Tubulindeacetylierung allein würde allerdings den Effekt auf die Glucocorticoid-induzierte Genexpression nicht erklären. Eine 2006 publizierte Studie zeigte, dass beide katalytische HDAC6-Domänen für ihre vollständige Proteindeacetylaseaktivität erforderlich sind. Dass dies relevant für Tubacin hinsichtlich der Deacetylierung von HSP90 ist wurde 2009 bestätigt, da durch den Einsatz von Tubacin in MSK-Leuk1 Zellen hyperacetyliertes HSP90 nachgewiesen wurde (52,88). Somit führt bereits die Hemmung einer katalytischen HDAC6-Domäne, wie z.B. durch Tubacin, zur Hyperacetylierung von HSP90.

Diese Daten zeigen das Potential von Tubacin auf, die hepatische GR-Funktion zu modifizieren und somit für die pharmakologische Intervention zweckmäßig zu sein. Zwar zeigte sich durch TSA Behandlung ein gleichwertiger Effekt, einen potentiellen Vorteil selektiver HDAC6 Inhibition durch Tubacin gegenüber anderen unselektiven Inhibitoren wie z.B. TSA, stellt das geringer ausgeprägte pleiotrope Wirkungsspektrum dar (200).

4.3 Die hepatische Gluconeogenese

Die hepatische Gluconeogenese wird durch Glucocorticoide beeinflusst indem die Gene der bestimmenden Enzyme GR-vermittelt induziert werden (149). Für die Gene der Schlüsselenzyme PCX, PEPCK, FBP und G6P, welches im finalen Schritt der

Gluconeogenese, die Umwandlung von Glucose 6-phosphat in Glucose katalysiert, konnte in den Versuchen gezeigt werden, dass sie, wie alle anderen im Microarray induzierten Gene auch, in HDAC6-defizienten Mäusen signifikant schwächer reguliert werden als in den Wildtyp Vergleichstieren. Für G6P sowie FBP ist sogar in Abwesenheit von HDAC6 keine GR-vermittelte Induktion mehr zu verzeichnen. Die Umwandlung von Oxalacetat in Phosphoenolpyruvat wurde lange Zeit als der bestimmende Schritt der Gluconeogenese angesehen bis Burgess und Kollegen 2007 zeigen konnten, dass eine 90%ige Reduktion des hepatischen PEPCK Gehalts nur zu einer 40%igen Reduktion des Gluconeogenesefluxes führte (201). Diese Daten stellen die zentrale Rolle der PEPCK in Frage. Daher haben wir vier Gene des Gluconeogenesesignalwegs analysiert. Das jedes einzelne Gen bestimmend für den Glucoseoutput der Leber bzw. der Hepatozyten ist konnten diverse Studien zeigen, in denen diese Gene in Nagern überexprimiert wurden, was immer zu einer erhöhten Glucoseproduktion und Hyperglykämie führte (202–204).

Wie wir eindeutig belegen konnten führt Dexamethason zu einer Induktion aller vier Gene. Die Proteine PEPCK und G6P wurden exemplarisch ebenfalls auf Proteinebene analysiert und entsprechen den Ergebnissen der qPCR. Das Endprodukt der Gluconeogenese stellt die Glucose dar, die als Produkt im Überstand der Dexamethason-behandelten Hepatozyten ebenfalls gemessen wurde und den Genen und Proteinen der Gluconeogenese entsprechend in den Wildtypstieren stärker GR-vermittelt produziert und sezerniert wird, als in den HDAC6-defizienten Mäusen. Wie die oben bereits erwähnten Studien zur Überexpression der einzelnen Gene zeigen konnten, ist ein Anstieg der Gene ausreichend um eine Hyperglykämie und letztendlich auch Hyperinsulinämie und Insulinresistenz zu erzeugen.

4.4 Glucocorticoidvermittelte diabetogene Stoffwechsellaage

Eine gesteigerte Gluconeogenese hat einen wesentlichen Anteil an den pro-diabetogenen Effekten der Glucocorticoide und führt primär zur Hyperglykämie (141,149,202–204). Dass die diabetogenen Effekte der Glucocorticoide auf eine Modifizierung der hepatischen GR-Funktion zurückzuführen ist und nicht auf einen insulinsupprimierenden Effekt des Dexamethasons unterstützen zum einen die markante Hyperinsulinämie in den Dexamethason-behandelten Wildtypen und zum anderen haben Studien gezeigt, dass die Inaktivierung des GR in Streptozotocin-behandelten, diabetischen Mäusen zu einer signifikanten Verbesserung des Glucosestoffwechsels führte (205).

Nach dreiwöchiger Behandlung der Mäuse mit Dexamethason wurde eine signifikant erhöhte Glucosekonzentration im Blut der Wildtyp Mäuse festgestellt und mittels ipGTT eine signifikante Glucoseintoleranz aufgezeigt. Beides sind diabetogene Charakteristika und in den HDAC6-defizienten Nagern nicht festzustellen. In weiteren Versuchen konnten die Dexamethason-behandelten Wildtyp Mäuse im Gegensatz zu den gleichbehandelten HDAC6 Knockout-Tieren als hyperinsulinäm sowie insulinresistent charakterisiert werden. Mit Ausnahme der Hyperinsulinämie erscheinen die aufgezeigten glucosestoffwechselrelevanten Effekte relativ mild, um von einem Diabetes zu sprechen und auch die Ergebnisse der Gruppe um Semenkovic, die dem durchgeführten Tierversuch zugrunde lagen, zeigten wesentlich stärkere Effekte und einen ausgeprägten Diabetes durch Dexamethasonbehandlung (141). Warum die Effekte nicht stärker ausgeprägt sind, lässt sich leider nicht erklären, ist jedoch anhand der Tatsache, dass auch eine Corticosteroidbehandlung im Menschen ohne latenten Diabetes Mellitus nicht zu einer Ausprägung eines solchen oder zumindest nur in sehr milder Form führt, nicht abträglich. Gleich der Effektstärke konnten signifikante Verbesserungen der pro-diabetogenen Effekte der Glucocorticoidbehandlung durch HDAC6-Defizienz in vivo aufgezeigt werden.

Die Hauptursache hierfür wird grundsätzlich auf die veränderte Gluconeogenese und die damit verbundene Glucosebereitstellung der Leber zurückgeführt, jedoch sind weitere glucocorticoidale Effekte in für den Glucosestoffwechsel relevanten Organen wie dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe nicht ausgeschlossen. Daher wurde ansatzweise das Ansprechen dieser Organe auf Insulin hin untersucht und festgestellt, dass im Fettgewebe zwar tendenziell eine geringere Expression des bei Insulinresistenz sowie Dexamethasonbehandlung geringer exprimierten IRS1-Gens festgestellt, es zeigte sich jedoch keine Signifikanz, was bei den milden diabetogenen Effekten nicht ungewöhnlich erscheint (149,157,206).

Es ist bekannt, dass Glucocorticoidbehandlung zu einer Beeinträchtigung der insulinstimulierten Glucoseaufnahme im Muskel mit Einflussnahme auf die Insulinsignalkaskade führt (149,207). Daher wurde im Skelettmuskel beispielhaft für die Ausbildung einer Insulinresistenz auf Proteinebene die Stärke der Akt-Phosphorylierung analysiert, welche im Dexamethason-behandelten Wildtyp nach densitometrischer Auswertung zwar schwach jedoch signifikant niedriger ist, als in der vehikelbehandelten Kontrollgruppe und dieser Effekt wiederum ist in den HDAC6-defizienten Mäusen nicht existent.

Somit ist eine nicht ausschließlich durch die Steigerung der hepatischen Glucoseproduktion entstandene Glucosestoffwechselstörung zu verzeichnen. In Anbetracht der Ergebnisse zur HDAC6-Expression in den unterschiedlichen Organen und einer wesentlich niedrigeren Präsenz von HDAC6 in Fett und Skelettmuskel scheint ein Einfluss auf direkte glucocorticoidale Effekte in diesem Gewebe eher von untergeordneter Bedeutung und die signifikante Verbesserung der Akt-Phosphorylierung wohl eher ein Folgeeffekt der verbesserten Insulinresistenz und weniger eine Ursache. Weitere detaillierte Studien sind jedoch notwendig um die Bedeutung von HDAC6 für den Insulin- und Glucosestoffwechsel im Skelettmuskel weiter zu charakterisieren.

4.5 Glucocorticoidvermittelte Zytokinsuppression

Für eine Verbesserung des Nutzen-Risiko-Profiles verlangt es nicht nur nach der Verringerung des Risikos, wie es für die Effekte auf den Glucosestoffwechsel gezeigt werden konnte, sondern auch nach der Konstanz bzw. Verbesserung des Nutzens. Da die Glucocorticoide im Wesentlichen aufgrund ihrer anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften eingesetzt werden, sollte gezeigt werden, wie sich eine HDAC6 Defizienz auf diese erwünschten Effekte auswirkt. Glucocorticoide sind bekannt dafür, Zytokine wie IL1- β oder IL6 negativ zu regulieren. Daher wurden zunächst aus dem Blut der Versuchstiere mononukleäre Zellen isoliert und die mRNA Expression von IL1- β als erster Anhaltspunkt analysiert. Durch die geringe Probenmenge, die aus der gesamten Anzahl der Tiere gewonnen werden konnte, war es nicht möglich Einzelbestimmungen je Tier durchzuführen, sondern das Material jeder Gruppe musste vereinigt werden, um genug mRNA für die Analyse isolieren zu können. Daher diente dieses Ergebnis nur als Anhaltspunkt und ist statistisch nicht zu belegen. Die Genexpressionsanalyse von IL1- β liefert jedoch Hinweise auf den Erhalt der anti-inflammatorischen Wirkung von Dexamethason unter HDAC6 Suppression. Diese Ergebnisse sind konsistent mit Daten von Halili und Kollegen, bei denen HDAC6-Defizienz keine Auswirkungen auf die inflammatorische Genexpression in Knochenmark-derivatisierten Makrophagen zeigte (208).

Um weitere Hinweise über die anti-inflammatorische Wirkung von Dexamethason unter HDAC6 Einfluss zu erhalten, wurden die Proteinkonzentrationen der Zytokine IL1- β , IL6, IL10, TNF- α und IFN- γ im Blut der Versuchstiere analysiert. Das Resultat war ein Ausbleiben jeglicher Regulation, sei es durch Dexamethason oder durch den Mangel an HDAC6. In Anbetracht der Tatsache, dass in diesem Tiermodell keinerlei Inflammation erzeugt wurde, befinden sich die Blutzytokinkonzentrationen auf einem sehr niedrigen Niveau. Daher ist nicht davon auszugehen, dass eine weitere Suppression durch Dexamethason oder HDAC6-Defizienz stattfinden kann. Die vorliegenden

Ergebnisse geben nur erste Hinweise auf eine divergente, zelltypspezifische Funktion von HDAC6 auf GR-Effekte in Makrophagen und Hepatozyten. Alternativ wäre eine Dissoziation der transrepressiven von den transaktivierenden Effekten der Glucocorticoide durch HDAC6-Inhibition denkbar. Hier könnte zunächst in einem inflammatorischen Modell z.B. unter LPS Stimulation und Dexamethason-behandlung der Einfluss von HDAC6 auf weiterhin bestehende GR-vermittelte anti-inflammatorische Eigenschaften untersucht werden und sollten trotz HDAC6-Inhibitor die Wirksamkeit Dexamethasons gegeben sein, empfehlen sich Induktionsstudien an GR-regulierten Promotern in diesen Zellen um Rückschlüsse auf die Transaktivierungs- und Transrepressionsfunktion des GR ziehen zu können.

Ein weiteres interessantes Modell um die Effekte einer HDAC6-Inhibition weiter zu erforschen wäre ein latenter Diabetes Mellitus Typ 2, der aus einem weiteren Grund (z.B. Organtransplantation) eine Glucocorticoidtherapie erfordert. Der Diabetes ist selbst von einer gesteigerten Inflammation im Fettgewebe gekennzeichnet, kommt nun eine Erkrankung hinzu, die den Einsatz von Glucocorticoiden erfordert, wäre es hier notwendig, gegen die Entstehung eines manifesten Typ 2 Diabetes Mellitus vorzugehen und hierfür könnten selektive HDAC6-Inhibitoren eine interessante Option darstellen.

Die selektive pharmakologische GR-Beeinflussung, also eine weitere Aktivierung der Transrepression, welche wesentlich für die anti-inflammatorischen Effekte der Glucocorticoide verantwortlich ist, jedoch eine ausbleibende Aktivierung der Transaktivierungsfunktion des GR stellen ein bereits seit etlichen Jahren erforschtes Feld dar. Es konnte bereits in der Mitte der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts gezeigt werden, dass Mäuse mit einer GR-Defizienz nicht lebensfähig sind jedoch erforschten Reichardt et al. bereits in den Jahren 1998 und 2001, dass ein mutierter GR, welcher nicht in der Lage ist zu homodimerisieren im Gegensatz zu einem fehlenden GR die Lebensfähigkeit der Tiere nicht einschränkt und außerdem die anti-inflammatorischen Eigenschaften der Glucocorticoide erhalten bleiben (134,209,210). Dies führte, seit

zunehmend einer Dekade, zur Entwicklung und Erforschung zahlreicher SEGRA (211–214). Von diesen Substanzen verspricht man sich, sie seien pharmakologisch wirksame anti-inflammatorische Verbindung mit besserem therapeutischen Index als die herkömmlichen Glucocorticoide, also mit verminderten unerwünschten Effekten und in der Tat hat sich für einige Substanzen gezeigt, dass dissoziierte Wirkungen möglich sind, jedoch steht bis dato ein Nachweis klinischer Effizienz aus (215–218). Für HDAC6-Inhibitoren konnte durch diese Arbeit und andere Forscher bisher nicht gezeigt werden, ob lediglich die Transaktivierungsfunktion des GR eingeschränkt ist, oder ob Auswirkungen auf die Transrepression bestehen. Die Tatsache, dass in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten erkannt wurde, dass der negative Feedbackmechanismus der Glucocorticoide, welcher über den Transrepressionsmechanismus abläuft (134) auch in HDAC6-defizienten Mäusen noch aktiv ist, lässt vermuten, dass die HDAC6-Inhibition zu einer Modulation der GR-Wirkmechanismen führen könnte und sollte auf molekularer Ebene weiter untersucht werden.

4.6 Ausblick

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit belegt werden, dass HDAC6 durch die Beeinflussung der hepatischen nukleären GR Translokation, ein essentieller Regulator der hepatischen glucocorticoidstimulierten Gluconeogenese und der folgenden Beeinträchtigung des Glucosestoffwechsels ist. Selektive pharmakologische HDAC6-Inhibition vermindert die corticosteroidinduzierte Expression gluconeogenese-relevanter Gene, wodurch sich eine möglich therapeutische Interventionsmöglichkeit gegen die pro-diabetogenen Effekte der Glucocorticoide ergibt.

Ob die anti-inflammatorischen Effekte der Glucocorticoide bei HDAC6-Inhibition persistieren, ob HDAC6-Inhibition über weitere Mechanismen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel hat und ob zeitnahe Einsatz von HDAC6 Inhibitoren in vivo bei

Glucocorticoidgabe zu vergleichbaren Effekten führt bleibt in weiteren Studien zu erforschen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Glucocorticoidrezeptor (GR) ist ein wichtiger Regulator der Insulinsensitivität und Glucosetoleranz. Da bereits für die Histon Deacetylase 6 (HDAC6) gezeigt wurde, dass diese das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) deacetyliert und dieses in Abhängigkeit seines Acetylierungsstatus die korrekte Ausbildung einer ligandenbindungsfähigen Konformation des GR vermittelt, wurde mit dieser Arbeit der Effekt von HDAC6 auf die GR Funktion im Glucosestoffwechsel in vivo und in vitro untersucht.

Für diese Studie wurde sowohl mit primären Hepatozyten von Wildtyp und HDAC6-defizienten Mäusen, als auch mit den entsprechenden chronisch Vehikel- als auch Dexamethason-behandelten Mäusen gearbeitet. Zusätzlich wurden Untersuchungen mit verschiedenen HDAC Inhibitoren in vitro in H4IIE Rattenhepatomzellen durchgeführt.

Die primären Hepatozyten wurden mit einem GR-eGFP-Konstrukt transfiziert, bevor sie mit Dexamethason stimuliert wurden, und es zeigte sich in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse eine eingeschränkte nukleäre Translokationsfähigkeit des GR in den HDAC6-defizienten verglichen mit den Wildtyp Hepatozyten. Dieser Effekt wurde durch die Western Blot Analyse des GR-Proteingehalts in den nukleären sowie zytoplasmatischen Fraktionen der Lebern der entsprechenden chronisch Dexamethason- sowie Vehikel-behandelten Mäuse bestätigt.

Aus diesen Lebern wurde ebenfalls RNA gewonnen und diese hinsichtlich der Genexpression des gesamten Genoms mit einem Microarray untersucht. Die Analyse bestätigte, dass HDAC6 kein Transkriptionsregulator ist, aber die GR-vermittelte Genregulation einschränkt.

Die Expression der bestimmenden Gene der hepatischen Gluconeogenese Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK), Glucose 6-Phosphatase (G6P), Pyruvatcarboxylase (PCX) und Fructose 1,6-Bisphosphatase (FBP) wurden mittels

qPCR untersucht: alle vier Gene wurden im Wildtyp signifikant durch Dexamethason induziert. Im Gegensatz dazu war die Dexamethason-induzierte gesteigerte RNA - Expression von G6P und FBP in den HDAC6-defizienten Mäusen völlig aufgehoben und die Induktion der PEPCK und PCX Genexpression durch fehlendes HDAC6 signifikant gegenüber den Dexamethason-behandelten Wildtypmäusen reduziert; es bestand allerdings immer noch eine signifikante Induktion der PEPCK und PCX verglichen mit den Vehikel-behandelten HDAC6-Knockout Mäusen. Zusätzlich wurde dieser Effekt in vitro in H4IIE Zellen durch den Einsatz von Tubacin, einem selektiven HDAC6 Inhibitor, bestätigt. Hier vermochte Tubacin die Dexamethason-induzierte G6P und PEPCK Genexpression signifikant einzuschränken.

Wie die Ergebnisse der Untersuchungen in Dexamethason-stimulierten Wildtyp und HDAC6 Knockout Hepatozyten ergaben, reicht die durch HDAC6-Defizienz bedingte Reduktion der Expressionsinduktion dieser Gene aus um auch die entsprechende Glucosefreisetzung signifikant zu vermindern.

In Wildtyp Mäusen resultiert die chronische Injektion Dexamethasons in einer deutlichen Glucoseintoleranz, Insulinresistenz und Hyperinsulinämie. In HDAC6 Knockout Mäusen hingegen war die Glucocorticoid-induzierte Glucoseintoleranz vollständig aufgehoben. Des Weiteren entwickelte sich keine Hyperinsulinämie in den HDAC6-defizienten Tieren und auch die GR-vermittelte Insulinresistenz war merklich verbessert, wie sich in einem Insulintoleranztest heraus stellte.

Diesen Ergebnissen entsprechend, scheint es angemessen, HDAC6 als wichtigen Regulator der Funktion des GR im Glucosestoffwechsel zu bezeichnen. HDAC6-Defizienz bedingt eine Beeinträchtigung der hepatischen nukleären GR Translokation, führt somit zu einer eingeschränkten Aktivierung der Gluconeogenese und schlussendlich zu einer Verbesserung der Glucocorticoid-induzierten diabetogenen Stoffwechsellage. Die Modulation der GR Funktion durch selektive HDAC6 Inhibition könnte daher eine Möglichkeit zur therapeutischen Einflussnahme darstellen.

6 SUMMARY

The glucocorticoid receptor (GR) is an important regulator of insulin sensitivity and glucose tolerance. In view of the fact that in vitro the histone deacetylase 6 (HDAC6) has been shown to be a major deacetylase of heat shock protein 90 (HSP90) which in turn is mediating correct folding of the GR and subsequent ligand interaction depending on HSP90 acetylation status the effect of HDAC6 on GR function in a metabolic context in vivo and in vitro was investigated.

For this study primary hepatocytes isolated from wildtype and HDAC6-deficient mice as well as chronically dexamethasone- and vehicle-treated wildtype and HDAC6 knockout mice (3 weeks i.p. injection; 1mg/kg body weight) were used for experiments. Additionally experiments in H4IIE rat hepatoma cells with different HDAC inhibitors were performed.

Primary hepatocytes isolated from wildtype and HDAC6 knockout mice were transfected with a GR-eGFP plasmid before stimulation with dexamethasone revealing attenuated glucocorticoid-induced nuclear translocation of the GR in HDAC6-deficient hepatocytes by analysis with fluorescence microscopy. This effect was confirmed by evaluating GR protein content in cytoplasmic and nuclear fractions of livers of the corresponding chronically dexamethasone- and vehicle-treated mice.

Isolated mRNA from the livers of the animals was used to conduct a whole genome microarray (Affymetrix®) confirming that HDAC6 does not act as a transcriptional regulator but attenuates GR-mediated gene regulation.

The expression of major hepatic gluconeogenic genes such as phosphoenol pyruvatecarboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G6P), pyruvate carboxylase (PCX) and fructose-1,6-bisphosphatase (FBP) was evaluated by qPCR: all genes were

significantly upregulated in livers of wildtype mice after dexamethasone treatment. In contrast, dex-induced G6P and FBP upregulation was absent in HDAC6-deficient mice and PEPCK and PCX induction by dexamethasone was significantly reduced compared to dexamethasone treated wildtype mice although significantly induced compared to vehicle treated HDAC6 knockout mice. In addition this effect of HDAC6 was confirmed by the use of tubacin as selective HDAC6-inhibitor in H4IIE hepatoma cells. Here tubacin potently blocked dexamethasone-induced gene expression of G6P and PEPCK.

Reduced gene expression of some of the analyzed genes is evidently sufficient to reduce glucose output in primary hepatocytes as dexamethasone stimulation in wildtype and HDAC6-deficient hepatocytes revealed.

In wildtype mice chronic dexamethasone injection resulted in a marked glucose intolerance, insulin resistance and hyperinsulinemia. In HDAC6 knockout mice glucocorticoid-induced glucose intolerance was completely abolished. Furthermore, dexamethasone-mediated hyperinsulinemia in wildtype mice did not occur in HDAC-deficient mice and GR-mediated insulin resistance in these mice was ameliorated ascertained by an insulin tolerance test.

Along the results of this study it deems appropriate to say HDAC6 resembles an important regulator of metabolic GR-function for HDAC6 deficiency leads to impaired hepatic GR-translocation which in turn leads to attenuation of gluconeogenesis and eventually to an amelioration of glucocorticoid-induced metabolic derangement. Modulation of GR-function by selective HDAC6 inhibition may therefore provide an opportunity for therapeutic intervention.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Kornberg RD. Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 1977;46:931–54.
2. Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):259–72.
3. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997 Sep 18;389(6648):251–60.
4. Luger K, Richmond TJ. The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998 Apr;8(2):140–6.
5. Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003 Apr;13(2):127–35.
6. Dorigo B, Schalch T, Bystricky K, Richmond TJ. Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J. Mol. Biol.* 2003 Mar 14;327(1):85–96.
7. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1074–80.
8. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):41–5.
9. Shiio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Nov 11;100(23):13225–30.
10. Hansen JC. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2002;31:361–92.

11. Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002 Apr;12(2):142–8.
12. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1964 May;51(5):786–94.
13. Phillips DM. The presence of acetyl groups of histones. *Biochem. J.* 1963 May;87:258–63.
14. Inoue A, Fujimoto D. Enzymatic deacetylation of histone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969 Jul 7;36(1):146–50.
15. Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays.* 1998 Aug;20(8):615–26.
16. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* 2007;76:75–100.
17. Kadosh D, Struhl K. Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell.* 1997 May 2;89(3):365–71.
18. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000 Jun;64(2):435–59.
19. Kouzarides T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 2000 Mar 15;19(6):1176–9.
20. Candau R, Zhou JX, Allis CD, Berger SL. Histone acetyltransferase activity and interaction with ADA2 are critical for GCN5 function in vivo. *EMBO J.* 1997 Feb 3;16(3):555–65.

21. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, et al. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. 1996 Mar 22;84(6):843–51.
22. Yang X-J, Seto E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008 Mar;9(3):206–18.
23. Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011;2011:371832.
24. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A Mammalian Histone Deacetylase Related to the Yeast Transcriptional Regulator Rpd3p. *Science*. 1996 Apr 19;272(5260):408–11.
25. Zhou X, Marks PA, Rifkind RA, Richon VM. Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(19):10572–7.
26. Kao H-Y, Downes M, Ordentlich P, Evans RM. Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes & Development*. 2000 Jan 1;14(1):55–66.
27. Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999 Apr 27;96(9):4868–73.
28. Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Zhu Y, Kirkpatrick R, Zhang G-F, et al. Cloning and Characterization of a Novel Human Class I Histone Deacetylase That Functions as a Transcription Repressor. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 May 19;275(20):15254–64.
29. Yang W-M, Yao Y-L, Sun J-M, Davie JR, Seto E. Isolation and Characterization of cDNAs Corresponding to an Additional Member of the Human Histone Deacetylase Gene Family. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 Oct 31;272(44):28001–7.

30. Yang W-M, Inouye C, Zeng Y, Bearss D, Seto E. Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 Nov 12;93(23):12845–50.
31. Guardiola AR, Yao T-P. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J. Biol. Chem.* 2002 Feb 1;277(5):3350–6.
32. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*. 1999 Sep 9;401(6749):188–93.
33. Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, et al. Acetylation of the C Terminus of Ku70 by CBP and PCAF Controls Bax-Mediated Apoptosis. *Molecular Cell*. 2004 Mar 5;13(5):627–38.
34. Kovacs JJ, Murphy PJM, Gaillard S, Zhao X, Wu J-T, Nicchitta CV, et al. HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Molecular Cell*. 2005 May 27;18(5):601–7.
35. Li AG, Piluso LG, Cai X, Gadd BJ, Ladurner AG, Liu X. An Acetylation Switch in p53 Mediates Holo-TFIID Recruitment. *Molecular Cell*. 2007 Nov 9;28(3):408–21.
36. Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation Is Indispensable for p53 Activation. *Cell*. 2008 May 16;133(4):612–26.
37. Nusinzon I, Horvath CM. Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Dec 9;100(25):14742–7.
38. Mahlknecht U, Schnittger S, Landgraf F, Schoch C, Ottmann OG, Hiddemann W, et al. Assignment of the human histone deacetylase 6 gene (HDAC6) to X

- chromosome p11.23 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 2001;93(1-2):135–6.
39. Kaffman A, O’Shea EK. Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999;15:291–339.
40. Verdel A, Curtet S, Brocard M-P, Rousseaux S, Lemerrier C, Yoshida M, et al. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Current Biology.* 2000 Jun 15;10(12):747–9.
41. Bertos NR, Gilquin B, Chan GKT, Yen TJ, Khochbin S, Yang X-J. Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J. Biol. Chem.* 2004 Nov 12;279(46):48246–54.
42. Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, et al. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999;96(16):9112–7.
43. Palijan A, Fernandes I, Bastien Y, Tang L, Verway M, Kourelis M, et al. Function of Histone Deacetylase 6 as a Cofactor of Nuclear Receptor Coregulator LCoR. *J Biol Chem.* 2009 Oct 30;284(44):30264–74.
44. Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, et al. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell.* 2009 Sep 4;138(5):1019–31.
45. Boyault C, Sadoul K, Pabion M, Khochbin S. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene.* 2007 Aug 13;26(37):5468–76.

46. Boyault C, Gilquin B, Zhang Y, Rybin V, Garman E, Meyer-Klaucke W, et al. HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *EMBO J.* 2006 Jul 26;25(14):3357–66.
47. Seigneurin-Berny D, Verdel A, Curtet S, Lemerrier C, Garin J, Rousseaux S, et al. Identification of Components of the Murine Histone Deacetylase 6 Complex: Link between Acetylation and Ubiquitination Signaling Pathways. *Mol Cell Biol.* 2001 Dec;21(23):8035–44.
48. Hook SS, Orian A, Cowley SM, Eisenman RN. Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 Oct 15;99(21):13425–30.
49. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao T-P. The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell.* 2003 Dec 12;115(6):727–38.
50. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* 2002 May 23;417(6887):455–8.
51. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology.* 2000 Dec 1;10(12):524–30.
52. Zhang Y, Gilquin B, Khochbin S, Matthias P. Two catalytic domains are required for protein deacetylation. *J. Biol. Chem.* 2006 Feb 3;281(5):2401–4.
53. Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, et al. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* 2003 Mar 3;22(5):1168–79.
54. Zou H, Wu Y, Navre M, Sang B-C. Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006 Mar 3;341(1):45–50.

55. Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, et al. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* 2002 Dec 16;21(24):6820–31.
56. Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, et al. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* 2006 Nov 7;16(21):2166–72.
57. Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J. Biol. Chem.* 2005 Dec 2;280(48):40282–92.
58. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Apr 15;100(8):4389–94.
59. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, et al. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol. Cell.* 2007 Jul 20;27(2):197–213.
60. Li Y, Zhang X, Polakiewicz RD, Yao T-P, Comb MJ. HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 2008 May 9;283(19):12686–90.
61. Parmigiani RB, Xu WS, Venta-Perez G, Erdjument-Bromage H, Yaneva M, Tempst P, et al. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008 Jul 15;105(28):9633–8.
62. Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2005 Jul 22;280(29):26729–34.

63. Minami Y, Kimura Y, Kawasaki H, Suzuki K, Yahara I. The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 1994 Feb;14(2):1459–64.
64. Parsell DA, Lindquist S. The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins. *Annu. Rev. Genet.* 1993 Dec;27(1):437–96.
65. Pearl LH, Prodromou C. Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery. *Annu. Rev. Biochem.* 2006 Jun;75(1):271–94.
66. Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Oct;5(10):781–91.
67. Scheibel T, Siegmund HI, Jaenicke R, Ganz P, Lilie H, Buchner J. The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 Feb 16;96(4):1297–302.
68. Yu X, Guo ZS, Marcu MG, Neckers L, Nguyen DM, Chen GA, et al. Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 Expression in Lung Cancer Cells by Depsipeptide FR901228. *Journal of the National Cancer Institute.* 2002 Apr 3;94(7):504–13.
69. Bali P, Pranpat M, Swaby R, Fiskus W, Yamaguchi H, Balasis M, et al. Activity of suberoylanilide hydroxamic Acid against human breast cancer cells with amplification of her-2. *Clin. Cancer Res.* 2005 Sep 1;11(17):6382–9.
70. Nimmanapalli R, Fuino L, Bali P, Gasparetto M, Glozak M, Tao J, et al. Histone Deacetylase Inhibitor LAQ824 Both Lowers Expression and Promotes Proteasomal Degradation of Bcr-Abl and Induces Apoptosis of Imatinib Mesylate-sensitive or -refractory Chronic Myelogenous Leukemia-Blast Crisis Cells. *Cancer Research.* 2003;63(16):5126–35.

71. Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, et al. An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol. Cell.* 2007 Jan 12;25(1):151–9.
72. Bertrand P. Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2010 Jun;45(6):2095–116.
73. Wong JC, Hong R, Schreiber SL. Structural Biasing Elements for In-Cell Histone Deacetylase Paralog Selectivity. *Journal of the American Chemical Society.* 2003 May 1;125(19):5586–7.
74. Wang H, Dymock BW. New patented histone deacetylase inhibitors. *Expert Opin. Ther. Patents.* 2009 Dec;19(12):1727–57.
75. Dickinson M, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors: potential targets responsible for their anti-cancer effect. *Invest New Drugs.* 2010 Dec;28(Suppl 1):3–20.
76. Butler KV, Kalin J, Brochier C, Vistoli G, Langley B, Kozikowski AP. Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* 2010 Aug 11;132(31):10842–6.
77. Ueda H, Nakajima H, Hori Y, Fujita T, Nishimura M, Goto T, et al. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity. *J. Antibiot.* 1994 Mar;47(3):301–10.
78. Shigematsu N, Ueda H, Takase S, Tanaka H, Yamamoto K, Tada T. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. II. Structure determination. *J. Antibiot.* 1994 Mar;47(3):311–4.
79. Ueda H, Manda T, Matsumoto S, Mukumoto S, Nishigaki F, Kawamura I, et al. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium*

violaceum No. 968. III. Antitumor activities on experimental tumors in mice. *J. Antibiot.* 1994 Mar;47(3):315–23.

80. Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee K-H, Nishiyama M, Nakajima H, et al. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res.* 2002 Sep 1;62(17):4916–21.

81. Shiraga T, Tozuka Z, Ishimura R, Kawamura A, Kagayama A. Identification of cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of FK228, a potent histone deacetylase inhibitor, in human liver microsomes. *Biol. Pharm. Bull.* 2005 Jan;28(1):124–9.

82. Richon VM, Webb Y, Merger R, Sheppard T, Jursic B, Ngo L, et al. Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Jun 11;93(12):5705–8.

83. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 Mar 17;95(6):3003–7.

84. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 1990 Oct 5;265(28):17174–9.

85. Kelly WK, Marks PA. Drug Insight: histone deacetylase inhibitors—development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nat Clin Prac Oncol.* 2005 Mar;2(3):150–7.

86. Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J. Antibiot.* 1976 Jan;29(1):1–6.

87. Yoshida M, Hoshikawa Y, Koseki K, Mori K, Beppu T. Structural specificity for biological activity of trichostatin A, a specific inhibitor of mammalian cell cycle with

potent differentiation-inducing activity in Friend leukemia cells. *J. Antibiot.* 1990 Sep;43(9):1101–6.

88. Kekatpure VD, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. HDAC6 Modulates Hsp90 Chaperone Activity and Regulates Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling. *J Biol Chem.* 2009 Mar 20;284(12):7436–45.

89. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie & Pathobiochemie.* 8th ed. Heidelberg: Springer; 2007.

90. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 10th ed. München: Elsevier; 2009.

91. Kaiser H, Kley HK. *Cortisontherapie.* 11th ed. Stuttgart-New York: Thieme; 2002.

92. Whitnall MH. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Progress in Neurobiology.* 1993 May;40(5):573–629.

93. Sandberg AA, Slaunwhite WR Jr, Antoniades HN. The binding of steroids and steroid conjugates to human plasma proteins. *Recent Prog. Horm. Res.* 1957;13:209–60; discussion 260–7.

94. Slaunwhite WR Jr, Sandberg AA. Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma. *J. Clin. Invest.* 1959 Feb;38(2):384–91.

95. Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH. Corticosteroid therapy in severe illness. *N. Engl. J. Med.* 1997 Oct 30;337(18):1285–92.

96. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci.* 2006;8(4):367–81.

97. Salassa RM, Bennett WA, Keating FR Jr, Sprague RG. Postoperative adrenal cortical insufficiency; occurrence in patients previously treated with cortisone. *J Am Med Assoc.* 1953 Aug 15;152(16):1509–15.
98. Schwabe U, Paffrath D, editors. *Arzneiverordnungs-Report 2010* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [cited 2011 Aug 7]. Available from: <http://www.springerlink.com/content/978-3-642-13380-0#section=866629&page=11&locus=0>
99. Song I-H, Gold R, Straub RH, Burmester G-R, Buttgereit F. New glucocorticoids on the horizon: repress, don't activate! *J. Rheumatol.* 2005 Jul;32(7):1199–207.
100. Trikudanathan S, McMahon GT. Optimum management of glucocorticoid-treated patients. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 May;4(5):262–71.
101. Weinberger C, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product. *Nature.* 1985 Jan 19;318(6047):670–2.
102. Lu NZ, Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004 Jun;1024:102–23.
103. Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006 Jun;1069:1–9.
104. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell.* 1999 Apr 16;97(2):161–3.
105. Jewell CM, Webster JC, Burnstein KL, Sar M, Bodwell JE, Cidlowski JA. Immunocytochemical analysis of hormone mediated nuclear translocation of wild type and mutant glucocorticoid receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1995 Nov;55(2):135–46.

106. Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007 Sep 15;275(1-2):2-12.
107. Htun H, Barsony J, Renyi I, Gould DL, Hager GL. Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 May 14;93(10):4845-50.
108. Picard D, Yamamoto KR. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1987 Nov;6(11):3333-40.
109. DeFranco DB. Role of molecular chaperones in subnuclear trafficking of glucocorticoid receptors. *Kidney Int.* 2000 Apr;57(4):1241-9.
110. Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 1993 Oct 15;268(29):21455-8.
111. Pratt WB, Dittmar KD. Studies with Purified Chaperones Advance the Understanding of the Mechanism of Glucocorticoid Receptor-hsp90 Heterocomplex Assembly. *Trends Endocrinol. Metab.* 1998 Aug;9(6):244-52.
112. Grenert JP, Johnson BD, Toft DO. The Importance of ATP Binding and Hydrolysis by Hsp90 in Formation and Function of Protein Heterocomplexes. *Journal of Biological Chemistry.* 1999 Jun 18;274(25):17525-33.
113. Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Denis M, Gustafsson JA. The transformed glucocorticoid receptor has a lower steroid-binding affinity than the nontransformed receptor. *Biochemistry.* 1990 Feb 20;29(7):1880-6.
114. Pratt WB, Morishima Y, Murphy M, Harrell M. Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(172):111-38.

115. Carrigan A, Walther RF, Salem HA, Wu D, Atlas E, Lefebvre YA, et al. An active nuclear retention signal in the glucocorticoid receptor functions as a strong inducer of transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 2007 Apr 13;282(15):10963–71.
116. Freedman ND, Yamamoto KR. Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Mol. Biol. Cell.* 2004 May;15(5):2276–86.
117. Barnes PJ. Glucocorticosteroids: current and future directions. *British Journal of Pharmacology.* 2011 May 1;163(1):29–43.
118. De Bosscher K, Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 2009 Mar;23(3):281–91.
119. Kassel O, Herrlich P. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007 Sep 15;275(1-2):13–29.
120. Chandler VL, Maler BA, Yamamoto KR. DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo. *Cell.* 1983 Jun;33(2):489–99.
121. Charron J, Drouin J. Glucocorticoid inhibition of transcription from episomal proopiomelanocortin gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986 Dec;83(23):8903–7.
122. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994 Jan 18;91(2):752–6.

123. Nordeen SK, Suh BJ, Kühnel B, Hutchison CA. Structural Determinants of a Glucocorticoid Receptor Recognition Element. *Molecular Endocrinology*. 1990 Dec 1;4(12):1866–73.
124. Scott DK, Strömstedt P-E, Wang J-C, Granner DK. Further Characterization of the Glucocorticoid Response Unit in the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene. The Role of the Glucocorticoid Receptor-Binding Sites. *Molecular Endocrinology*. 1998 Apr 1;12(4):482–91.
125. Tai TC, Claycomb R, Her S, Bloom AK, Wong DL. Glucocorticoid Responsiveness of the Rat PhenylethanolamineN-Methyltransferase Gene. *Molecular Pharmacology*. 2002 Jun 1;61(6):1385–92.
126. Schoneveld OJLM, Gaemers IC, Das AT, Hoogenkamp M, Renes J, Ruijter JM, et al. Structural requirements of the glucocorticoid-response unit of the carbamoyl-phosphate synthase gene. *Biochem. J*. 2004 Sep 1;382(Pt 2):463–70.
127. Stocklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*. 1996 Oct 24;383(6602):726–8.
128. Richard-Foy H, Hager GL. Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid-inducible MMTV promoter. *EMBO J*. 1987 Aug;6(8):2321–8.
129. Ford J, McEwan IJ, Wright APH, Gustafsson J-Å. Involvement of the Transcription Factor IID Protein Complex in Gene Activation by the N-Terminal Transactivation Domain of the Glucocorticoid Receptor in Vitro. *Molecular Endocrinology*. 1997;11(10):1467–75.
130. Malkoski SP, Dorin RI. Composite Glucocorticoid Regulation at a Functionally Defined Negative Glucocorticoid Response Element of the Human Corticotropin-Releasing Hormone Gene. *Molecular Endocrinology*. 1999 Oct 1;13(10):1629–44.

131. Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, et al. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J.* 1994 Sep 1;13(17):4087–95.
132. Heck S, Bender K, Kullmann M, Gottlicher M, Herrlich P, Cato ACB. I[κ]B[α]-independent downregulation of NF-[κ]B activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1997;16(15):4698–707.
133. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, et al. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Molecular Endocrinology.* 1995 Apr 1;9(4):401–12.
134. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell.* 1998 May 15;93(4):531–41.
135. Wargnier A, Lafaurie C, Legros-Maïda S, Bourge J-F, Sigaux F, Sasportes M, et al. Down-regulation of Human Granzyme B Expression by Glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry.* 1998 Dec 25;273(52):35326–31.
136. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science.* 1995 Oct 13;270(5234):286–90.
137. Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell.* 1997 May 2;89(3):413–24.
138. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Plaisance S, Boone E, Haegeman G. Glucocorticoids repress NF- κ B-driven genes by disturbing the interaction

of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 Apr 11;97(8):3919–24.

139. Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, et al. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*. 1996 May 3;85(3):403–14.

140. Walsh LJ, Wong CA, Pringle M, Tattersfield AE. Use of oral corticosteroids in the community and the prevention of secondary osteoporosis: a cross sectional study. *BMJ*. 1996 Aug 10;313(7053):344–6.

141. Bernal-Mizrachi C, Weng S, Feng C, Finck BN, Knutsen RH, Leone TC, et al. Dexamethasone induction of hypertension and diabetes is PPAR-alpha dependent in LDL receptor-null mice. *Nat. Med*. 2003 Aug;9(8):1069–75.

142. Gurwitz JH, Bohn RL, Glynn RJ, Monane M, Mogun H, Avorn J. Glucocorticoids and the risk for initiation of hypoglycemic therapy. *Arch. Intern. Med*. 1994 Jan 10;154(1):97–101.

143. Delaunay F, Khan A, Cintra A, Davani B, Ling ZC, Andersson A, et al. Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J. Clin. Invest*. 1997 Oct 15;100(8):2094–8.

144. Andrews RC, Walker BR. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin. Sci*. 1999 May;96(5):513–23.

145. Arner P, Gunnarsson R, Blomdahl S, Groth CG. Some characteristics of steroid diabetes: a study in renal-transplant recipients receiving high-dose corticosteroid therapy. *Diabetes Care*. 1983 Jan 1;6(1):23–5.

146. Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther*. 2002 Oct;96(1):23–43.

147. Hirsch IB, Paauw DS. Diabetes management in special situations. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1997 Sep;26(3):631–45.
148. van Raalte DH, Ouwens DM, Diamant M. Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? *Eur. J. Clin. Invest.* 2009 Feb;39(2):81–93.
149. Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007 Sep 15;275(1-2):43–61.
150. Brunstedt J, Nielsen JH. Direct long-term effect of hydrocortisone on insulin and glucagon release from mouse pancreatic islets in tissue culture. *Acta Endocrinologica.* 1981 Apr 1;96(4):498–504.
151. Karlsson S, Ostlund B, Myrsén-Axcrona U, Sundler F, Ahrén B. Beta cell adaptation to dexamethasone-induced insulin resistance in rats involves increased glucose responsiveness but not glucose effectiveness. *Pancreas.* 2001 Mar;22(2):148–56.
152. Lambillotte C, Gilon P, Henquin JC. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *Journal of Clinical Investigation.* 1997 Feb 1;99:414–23.
153. Davani B, Portwood N, Bryzgalova G, Reimer MK, Heiden T, Ostenson C-G, et al. Aged transgenic mice with increased glucocorticoid sensitivity in pancreatic beta-cells develop diabetes. *Diabetes.* 2004 Feb;53 Suppl 1:S51–9.
154. Caperuto LC, Anhê GF, Amanso AM, Ribeiro LM, Medina MC, Souza LC, et al. Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. *Endocrine.* 2006 Jun;29(3):391–8.
155. Buren J, Liu H, Jensen J, Eriksson J. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol

3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *European Journal of Endocrinology*. 2002 Mar 1;146(3):419–29.

156. Corporeau C, Foll CL, Taouis M, Gouygou J-P, Bergé J-P, Delarue J. Adipose tissue compensates for defect of phosphatidylinositol 3'-kinase induced in liver and muscle by dietary fish oil in fed rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006 Jan;290(1):E78–86.

157. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Funaki M, Inukai K, Katagiri H, et al. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes*. 2000 Oct;49(10):1700–8.

158. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim Y-B, Boss O, Hadro E, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001 Feb 8;409(6821):729–33.

159. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*. 1981 Dec;30(12):1000–7.

160. Giorgino F, Almahfouz A, Goodyear LJ, Smith RJ. Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. 1993 May 1;91:2020–30.

161. Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *Journal of Clinical Investigation*. 1993 Oct 1;92:2065–72.

162. Long W, Barrett EJ, Wei L, Liu Z. Adrenalectomy enhances the insulin sensitivity of muscle protein synthesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003 Jan;284(1):E102–9.

163. Weinstein SP, Paquin T, Pritsker A, Haber RS. Glucocorticoid-induced insulin resistance: dexamethasone inhibits the activation of glucose transport in rat skeletal muscle by both insulin- and non-insulin-related stimuli. *Diabetes*. 1995 Apr;44(4):441–5.
164. Weinstein SP, Wilson CM, Pritsker A, Cushman SW. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metab. Clin. Exp.* 1998 Jan;47(1):3–6.
165. Burén J, Liu H-X, Jensen J, Eriksson JW. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *Eur. J. Endocrinol.* 2002 Mar;146(3):419–29.
166. van Poelje PD, Potter SC, Erion MD. Fructose-1, 6-bisphosphatase inhibitors for reducing excessive endogenous glucose production in type 2 diabetes. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(203):279–301.
167. Consoli A. Role of liver in pathophysiology of NIDDM. *Diabetes Care.* 1992 Mar;15(3):430–41.
168. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 2004 Jul;114(2):147–52.
169. Walker BR. Cortisol—cause and cure for metabolic syndrome? *Diabetic Medicine.* 2006 Dec 1;23(12):1281–8.
170. Slavin BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J. Lipid Res.* 1994 Sep;35(9):1535–41.
171. Cole TG, Wilcox HG, Heimberg M. Effects of adrenalectomy and dexamethasone on hepatic lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 1982 Jan;23(1):81–91.

172. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med.* 2005 Feb;11(2):183–90.
173. Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen A-M, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, et al. Fat Accumulation in the Liver Is Associated with Defects in Insulin Suppression of Glucose Production and Serum Free Fatty Acids Independent of Obesity in Normal Men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2002 Jul 1;87(7):3023–8.
174. Schneider C, Sepp-Lorenzino L, Nimmesgern E, Ouerfelli O, Danishefsky S, Rosen N, et al. Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Dec 10;93(25):14536–41.
175. Tago K, Tsukahara F, Naruse M, Yoshioka T, Takano K. Hsp90 inhibitors attenuate effect of dexamethasone on activated NF- κ B and AP-1. *Life Sci.* 2004 Mar 5;74(16):1981–92.
176. Whitesell L, Cook P. Stable and specific binding of heat shock protein 90 by geldanamycin disrupts glucocorticoid receptor function in intact cells. *Mol. Endocrinol.* 1996 Jun;10(6):705–12.
177. Murphy PJM, Morishima Y, Kovacs JJ, Yao T-P, Pratt WB. Regulation of the Dynamics of hsp90 Action on the Glucocorticoid Receptor by Acetylation/Deacetylation of the Chaperone. *Journal of Biological Chemistry.* 2005 Oct 7;280(40):33792–9.
178. Zhang Y, Kwon S, Yamaguchi T, Cubizolles F, Rousseaux S, Kneissel M, et al. Mice Lacking Histone Deacetylase 6 Have Hyperacetylated Tubulin but Are Viable and Develop Normally. *Mol Cell Biol.* 2008 Mar;28(5):1688–701.

179. Kovacs JJ, Cohen TJ, Yao T-P. Chaperoning steroid hormone signaling via reversible acetylation. *Nucl Recept Signal*. 2005;3:e004.
180. Frenz U. Bestimmung der Energie und Makronährstoffverwertung bei Ratten unter Diäten mit leicht unterschiedlichen Aminosäuregehalten. Neue optimierte Methoden der indirekten Kalorimetrie. [Berlin]: Verlag Dr.Köster,; 1994.
181. Boschmann M, Aust L, Frenz U, Noack R. Energy expenditure and substrate oxidation rates of obese rats during a 12-day treatment with dexfenfluramine. *Ann. Nutr. Metab*. 1996;40(1):10–23.
182. Ferrante A, Thong YH. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J. Immunol. Methods*. 1980;36(2):109–17.
183. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350–4.
184. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol*. 2000;132:365–86.
185. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
186. Wettenhall JM, Smyth GK. limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics*. 2004 Dec 12;20(18):3705–6.
187. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.

188. Hall RK, Wang XL, George L, Koch SR, Granner DK. Insulin represses phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by causing the rapid disruption of an active transcription complex: a potential epigenetic effect. *Mol. Endocrinol.* 2007 Feb;21(2):550–63.
189. Herzog B, Hall RK, Wang XL, Waltner-Law M, Granner DK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha, as a transcription amplifier, is not essential for basal and hormone-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Mol. Endocrinol.* 2004 Apr;18(4):807–19.
190. Yasui K, Tanabe H, Okada N, Fukutomi R, Ishigami Y, Isemura M. Effects of catechin-rich green tea on gene expression of gluconeogenic enzymes in rat hepatoma H4IIE cells. *Biomed. Res.* 2010;31(3):183–9.
191. Shapiro S, Wilk M. An analysis of variance test for normality. *Biometrika.* 1965;52(3/4):591 ff.
192. Kassel O, Sancono A, Krätzschar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.* 2001 Dec 17;20(24):7108–16.
193. Lasa M, Abraham SM, Boucheron C, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. *Mol. Cell. Biol.* 2002 Nov;22(22):7802–11.
194. Firestone GL, Giampaolo JR, O’Keeffe BA. Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell. Physiol. Biochem.* 2003;13(1):1–12.

195. Westendorf JJ, Zaidi SK, Cascino JE, Kahler R, van Wijnen AJ, Lian JB, et al. Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol. Cell. Biol.* 2002 Nov;22(22):7982–92.
196. Rogatsky I, Wang J-C, Derynck MK, Nonaka DF, Khodabakhsh DB, Haqq CM, et al. Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Nov 25;100(24):13845–50.
197. Hall RK, Sladek FM, Granner DK. The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995 Jan 17;92(2):412–6.
198. Imai E, Stromstedt PE, Quinn PG, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Granner DK. Characterization of a complex glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 1990 Sep;10(9):4712–9.
199. Mitchell J, Noisin E, Hall R, O'Brien R, Imai E, Granner D. Integration of multiple signals through a complex hormone response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *Mol. Endocrinol.* 1994 May;8(5):585–94.
200. Wanczyk M, Roszczenko K, Marcinkiewicz K, Bojarczuk K, Kowara M, Winiarska M. HDACi--going through the mechanisms. *Front. Biosci.* 2011;16:340–59.
201. Burgess SC, He T, Yan Z, Lindner J, Sherry AD, Malloy CR, et al. Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. *Cell Metab.* 2007 Apr;5(4):313–20.
202. Trinh KY, O'Doherty RM, Anderson P, Lange AJ, Newgard CB. Perturbation of Fuel Homeostasis Caused by Overexpression of the Glucose-6-phosphatase Catalytic Subunit in Liver of Normal Rats. *Journal of Biological Chemistry.* 1998 Nov 20;273(47):31615–20.

203. Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F. Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(19):9151–4.
204. Visinoni S, Fam BC, Blair A, Rantzau C, Lamont BJ, Bouwman R, et al. Increased glucose production in mice overexpressing human fructose-1,6-bisphosphatase in the liver. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*. 2008 Nov 1;295(5):E1132–41.
205. Opherk C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmüller D, Schulze A, Schmid W, et al. Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol. Endocrinol*. 2004 Jun;18(6):1346–53.
206. Turnbow MA, Keller SR, Rice KM, Garner CW. Dexamethasone down-regulation of insulin receptor substrate-1 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem*. 1994 Jan 28;269(4):2516–20.
207. Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J. Clin. Invest*. 1992 Nov;90(5):1839–49.
208. Halili MA, Andrews MR, Labzin LI, Schroder K, Matthias G, Cao C, et al. Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J. Leukoc. Biol*. 2010 Jun;87(6):1103–14.
209. Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegelstein K, Schmid W, Aguzzi A, et al. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes & Development*. 1995 Jul 1;9(13):1608–21.

210. Reichardt HM, Tuckermann JP, Göttlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, et al. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 2001 Dec 17;20(24):7168–73.
211. Elmore SW, Coghlan MJ, Anderson DD, Pratt JK, Green BE, Wang AX, et al. Nonsteroidal selective glucocorticoid modulators: the effect of C-5 alkyl substitution on the transcriptional activation/repression profile of 2,5-dihydro-10-methoxy-2,2,4-trimethyl-1H-[1]benzopyrano[3,4-f]quinolines. *J. Med. Chem.* 2001 Dec 6;44(25):4481–91.
212. Elmore SW, Pratt JK, Coghlan MJ, Mao Y, Green BE, Anderson DD, et al. Differentiation of in vitro transcriptional repression and activation profiles of selective glucocorticoid modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004 Apr 5;14(7):1721–7.
213. Shah N, Scanlan TS. Design and evaluation of novel nonsteroidal dissociating glucocorticoid receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004 Oct 18;14(20):5199–203.
214. Wang J-C, Shah N, Pantoja C, Meijsing SH, Ho JD, Scanlan TS, et al. Novel arylpyrazole compounds selectively modulate glucocorticoid receptor regulatory activity. *Genes & Development.* 2006 Mar 15;20(6):689–99.
215. De Bosscher K, Berghe WV, Beck IME, Van Molle W, Hennuyer N, Hapgood J, et al. A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005 Nov 1;102(44):15827–32.
216. Schäcke H, Schottelius A, Döcke W-D, Strehlke P, Jaroch S, Schmees N, et al. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004 Jan 6;101(1):227–32.

217. Coghlan MJ, Jacobson PB, Lane B, Nakane M, Lin CW, Elmore SW, et al. A Novel Antiinflammatory Maintains Glucocorticoid Efficacy with Reduced Side Effects. *Molecular Endocrinology*. 2003 May 1;17(5):860–9.
218. Schäcke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K. Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): Novel ligands with an improved therapeutic index. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007 Sep 15;275(1-2):109–17.