

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Regulation von Steroidhormonrezeptoren
und ihre physiologischen Wirkungen am Beispiel
eines durch Stress regulierten Proteins**

Jan-Philip Schülke

aus

Mülheim an der Ruhr

2009

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. F. Holsboer betreut und von Prof. H. Zorbach vor der Fakultät vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 03.08.2009

Jan-Philip Schülke

Dissertation eingereicht am 03.08.2009

Mündliche Prüfung am 18.12.2009

1. Gutachter: Prof. F. Holsboer

2. Gutachter: Prof. H. Zorbach

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Psychiatrie unter der Betreuung von Dr. Theo Rein durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht oder werden zur Veröffentlichung vorbereitet:

Schülke, J.P.¹, Wochnik, G.M.¹, Lang-Rollin, I., Berning, B., Holsboer, F., Rein, T. (2009). Differential impact of tetratricopeptide repeat proteins on the steroid hormone receptors. *PloS One*, im Review.

Schmidt, M.V.¹, **Schülke, J.P.**¹, Liebl, C.¹, Avrabos, C., Wochnik, G., Zimmermann, N., Trümbach, D., Stiess, M., Bradke, F., Turck, C., Wurst, W, Eder, M., Holsboer, F, Müller, M.B., Rein, T. (2009). A novel Actin bundling factor links stress, synaptic plasticity and complex behaviour.
Manuskript in Vorbereitung.

¹ – Diese Autoren haben gleichwertige Beiträge geleistet.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst gerne bei Prof. Florian Holsboer für die Möglichkeit bedanken, am Max-Planck Institut für Psychiatrie meine Doktorarbeit durchzuführen.

Ich danke Prof. Haralabos Zorbas sehr herzlich für die Fachvertretung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU.

Besonders danken möchte ich Dr. Theo Rein für eine ausgezeichnete Betreuung, umfangreiche fachliche Unterstützung und die vielen anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Danken möchte ich auch unseren Kooperationspartnern aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Marianne Müller:

- Dr. Mathias Schmidt und PD Dr. Marianne Müller für fachliche Unterstützung
- Claudia Liebl für die Experimente, die als Grundlage für viele Fragestellungen dieser Arbeit dienten

Der gesamten Arbeitsgruppe Rein danke ich für ein angenehmes und äußerst kooperatives Arbeitsklima. Insbesondere:

- Dr. Gabi Wochnik für ihre Betreuung bei dem Erlernen vieler grundlegender molekularbiologischer Techniken
- Nicole Zimmermann für die Neuronenkulturen
- Barbara Berning, Kathrin Hafner und Anja Kretschmar für umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten
- Regina Knapp für ihre ausdauernden Bemühungen mir die bayerische Sprache beizubringen

Zudem danke ich:

- Prof. Christoph Turck und Dr. Giuseppina Maccarone für die Massenspektrometrieanalysen
- Dr. Christian Kozany und Bastiaan Hoogeland für fachliche Unterstützung bei der Proteinaufreinigung und Fluoreszenzspektroskopie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Die durch Glucorticoide vermittelte Stressantwort.....	15
1.2	Die Signaltransduktion von Steroidhormonen	17
1.3	Die Regulation von Steroidhormonrezeptoren durch den Multichaperonheterokomplex ...	19
1.4	TU3A ist ein stressreguliertes Gen	22
1.5	Zielsetzung.....	24
2	Materialien	25
2.1	Chemikalien	25
2.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.3	Geräte	28
2.4	Kits und weitere Materialien.....	29
2.5	Lösungen und Nährmedien.....	30
2.6	Enzyme und Proteine.....	31
2.7	Bakterienstämme	31
2.8	Zelllinien	31
2.9	Antikörper.....	32
2.10	Oligonukleotide	33
2.11	Plasmide	34
3	Methoden.....	37
3.1	Bakterienkultur	37
3.1.1	Herstellung kompetenter Bakterien	37
3.1.2	Transformation	37
3.2	Klonierungen.....	38
3.2.1	Präparation von RNA	38
3.2.2	Reverse Transkription.....	38
3.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.2.4	Agarosegelelektrophorese	39
3.2.5	DNA Ethanol fällung.....	40
3.2.6	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	40
3.2.7	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	40
3.2.8	Ligation von DNA	40
3.2.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
3.3	Nukleinsäurepräparation und -reinigung.....	41
3.3.1	Minipräparation von Plasmid DNA mittels Plasmid Minipräp Kit	41
3.3.2	Megapräparation von Plasmid DNA mit Nucleobond AX Säulen	41
3.3.3	Maxipräparation von Plasmid DNA mit Invitrogen PureLink HiPure Kit.....	42

3.4	Zellkulturmethoden.....	42
3.4.1	Präparation von steroidfreiem FBS.....	42
3.4.2	Propagation adhärenter Zellen	42
3.4.3	Lagerung	43
3.4.4	Präparation primärer Neuronenkulturen	43
3.4.5	Mycoplasmentest	43
3.4.6	Transfektionen	44
3.4.6.1	Elektroporation von Zelllinien.....	44
3.4.6.2	Elektroporation von primären Neuronen.....	44
3.4.6.3	Transfektion kationischem Polymer	45
3.4.7	Reportergenassays	45
3.4.8	Coimmunpräzipitation	47
3.4.9	MTT-Zellviabilitätstest.....	49
3.4.10	Immunfluoreszenzfärbung	49
3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	50
3.5.1	Erstellung von Proteinlysaten aus Zellen in Kultur	50
3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	51
3.5.2.1	Absorptionsmessung.....	51
3.5.2.2	BCA-Kit Bestimmung	51
3.5.2.3	2D-Quant Kit Bestimmung	51
3.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	51
3.5.4	Coomassiefärbungen.....	52
3.5.5	Immunoblotting.....	53
3.5.6	Densitometrie	54
3.5.7	Proteinexpression und -aufreinigung	54
3.5.8	Aktinzentrifugationsassay	55
3.5.9	Aktinpolymerisationsassay.....	56
3.5.10	F-Aktin-Visualisierungsassay.....	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Eine umfassende Analyse von TPR-Cofaktoren als Determinanten der Funktion von Steroidhormonrezeptoren	58
4.1.1	Untersuchungen zur Responsivität der Steroidhormonrezeptoren.....	58
4.1.2	TPR-Proteine beeinflussen die SR-Aktivität unterschiedlich	60
4.1.3	PP5 differenziert zwischen den beiden hoch homologen Rezeptoren GR und MR	66
4.1.4	Cyp40 kann den inhibitorischen Effekt von FKBP51 nicht aufheben	67
4.1.5	PP5 benötigt die Interaktion mit Hsp90, jedoch nicht seine Phosphataseaktivität, um den GR zu inhibieren	69
4.1.6	TPR-Proteine werden unterschiedlich effizient in SR-Heterokomplexe inkorporiert	71
4.1.7	TPR-Proteine rekrutieren differentiell Komponenten des Multichaperon-heterokomplex ..	77

4.1.8	TPR-Proteine beeinflussen die subzelluläre Verteilung des MR in Abwesenheit von Hormon	79
4.2	Molekulare Charakterisierung des durch Stress regulierten Gens TU3A.....	83
4.2.1	Bioinformatische Analyse der TU3A-Aminosäuresequenz.....	83
4.2.2	Identifikation von TU3A-Interaktionspartnern	84
4.2.3	GFP-TU3A colokalisiert mit F-Aktin	85
4.2.4	Erstellung von polyklonalen TU3A-Antikörpern mittels rekombinantem TU3A	86
4.2.5	TU3A-Proteinlevel werden durch Dexamethason reguliert	88
4.2.6	TU3A ist entlang von Axonen und Dendriten lokalisiert	89
4.2.7	TU3A colokalisiert mit Aktin in Neuronen	90
4.2.8	TU3A beeinflusst das Polymerisationsgleichgewicht von Aktin.....	91
4.2.9	TU3A bündelt Aktinfilamente	95
4.2.10	TU3A-Überexpression beeinflusst die Neuritenentwicklung.....	96
4.2.11	TU3A beeinflusst nicht die Morphologie von bereits entwickelten Neuriten in Neuro2a Zellen	99
4.2.12	TU3A hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität.....	100
5	Diskussion.....	102
5.1	Eine umfassende Analyse der Rolle von TPR-Proteinen in SR-Heterokomplexen.....	102
5.1.1	CHIP.....	105
5.1.2	Cyp40.....	106
5.1.3	PP5	107
5.1.4	FKBP51 und FKBP52	109
5.1.5	TPR2.....	111
5.1.6	XAP2.....	111
5.2	Die molekulare Funktion des stressregulierten Proteins TU3A.....	113
5.3	Ausblick.....	119
6	Zusammenfassung	120
7	Literaturverzeichnis.....	122
8	Abkürzungen	136

1 Einleitung

Das Bestreben eines Organismus, die für seine physiologischen Prozesse notwendigen konstanten Bedingungen aufrecht zu erhalten, gehört zu den Grundkonzepten der Biologie. Dieses als Homöostase bezeichnete Konzept beruht auf adaptiven Systemen, die über Regelkreisläufe von externen Faktoren hervorgerufene intrinsische Veränderungen ausgleichen. In diesem Zusammenhang werden unter dem Begriff „Stress“ häufig verschiedene Faktoren zusammengefasst, die die Homöostase beeinflussen. Neben dem Ausgleichen von kurzfristigen Veränderungen besitzt ein Organismus bei einer dauerhaft veränderten Umwelt zudem die Eigenschaft, durch eine Modulation der adaptiven Systeme die Homöostase dauerhaft zu erhalten. Bei dem von Sterling und Eyer (1988) eingeführten Konzept der Allostase wird diese Anpassung erreicht, indem der Organismus einen Zustand des labilen Gleichgewichts als Mechanismus verwendet, um die Homöostase eines Organismus an einen persistierenden Stressor anzupassen. Dieser meist mit einem verstärkten Energieverbrauch einhergehende Zustand erhöht zum einen die Anpassungsfähigkeit, jedoch auch die Vulnerabilität des Organismus hinsichtlich verschiedener Pathologien (Sterling, 1988). So ist bekannt, dass physikalischer oder psychologischer Stress das Risiko erhöht, psychiatrische Krankheitsbilder wie Depressionen oder posttraumatische Belastungsstörungen auszubilden. Dieses biologische Konzept der Adaption durch ein labiles Gleichgewicht kann an einem Beispiel verdeutlicht werden. In einer Studie wurden drei Tage alte Ratten für 24 h vom Muttertier getrennt und somit einem starken multifaktoriellen Stressor ausgesetzt. Ein nach 30 Monaten durchgeführter kognitiver Test zeigte, dass die dem Stressor ausgesetzten Tiere sich in zwei Gruppen untergliedern ließen. Die eine Gruppe zeigte gutes, die andere ein eingeschränktes Lernverhalten. Die ungestressten Kontrolltiere zeigten hingegen überwiegend kognitive Fähigkeiten von mittlerer Performance, die zwischen denen der zwei Gruppen gestresster Tiere lag (Oitzl, 2000). Somit bewirkt der Stress die Aufspaltung einer Population in Gruppen mit unterschiedlichem adaptivem Potential, wodurch die Möglichkeit einer effektiven Anpassung erhöht wird. Diese Aufspaltung führt in seiner Konsequenz jedoch zu einer Anpassung in nur einem Teil der Population. Daher könnte dieser Mechanismus die evolutionsbiologische Grundlage für die Tatsache bilden, dass beim Menschen die Stressexposition nur bei einer Gruppe von Individuen zu den oben genannten Krankheitsbildern führt, während andere Individuen adaptive Mechanismen entwickeln, die keine Pathologien verursachen.

Die physiologische Anpassung an einen Stressor erfolgt durch ein hierarchisch organisiertes Signaltransduktionssystem, das über Rückkopplungsmechanismen reguliert wird. Die Interpretation sensorischer Informationen als Stressor führt zur Aktivierung einer Signalkaskade, die in ihrer Konsequenz physiologische Prozesse moduliert, so dass der Organismus die Auswirkungen dieses Stressors bewältigen kann. In multizellulären Organismen beinhaltet diese Stressantwort eine zentrale Ausschüttung von Hormonen, die verschiedene Effekte in dem jeweiligen Zielgewebe bewirken. Steroide, die zu den lipophilen Hormonen gehören, vermitteln die Regulation von vielfältigen Prozessen wie Entwicklung, Zelldifferenzierung und Energiemetabolismus. Diese durch Steroidhormone vermittelte Regulierung verschiedener Prozesse kann Einflüsse auf das Verhalten und die Stimmung eines Organismus entfalten.

Die Regulation der Steroidhormonausschüttung erfolgt durch einen Rückkopplungsmechanismus, in dem das Hormon seine eigene Ausschüttung bzw. Produktion reguliert (Abb. 1). Die Ausschüttung von Steroidhormonen wird durch eine häufig als *Achse* bezeichnete neuroendokrine Kaskade reguliert, bei der ein neurologischer Reiz über mehrere Zwischenschritte im Hypothalamus und in der Hypophyse die Ausschüttung des Hormons in der jeweiligen endokrinen Drüse bewirkt. Hierbei führt eine entsprechende Verarbeitung von sensorischen Informationen in Gehirnstrukturen des limbischen Systems, wie dem Hippocampus, der Amygdala und dem präfrontalen Cortex, zu einer Sezernierung von (*engl.*) releasing Hormonen aus parvozellulären Neuronen des hypothalamischen Nucleus Paraventricularis (PVN). Diese Hormone werden über Pfortadergefäße zur Hypophyse geleitet und bewirken in endokrinen Zellen der Adenohypophyse die Expression von Vorläuferhormonen, aus denen Hormone prozessiert werden können. Diese Hypophysenhormone gelangen nach ihrer Ausschüttung über den Blutkreislauf zu den jeweiligen endokrinen Drüsen und bewirken dort die Ausschüttung der Steroidhormone. Die sezernierten Hormone regulieren ihre Konzentration im Blutkreislauf, indem sie in den neurosekretorischen Zellen des Hypothalamus und den endokrinen Zellen der Hypophyse die Aktivität der Hormonkaskade und somit ihre eigene Synthese inhibieren.

Die zu den Steroidhormonen gehörenden Glucocorticoide werden über die HPA-Achse (*engl.* Hypothalamus pituitary adrenal axis) reguliert. Hier führt die Interpretation sensorischer Informationen als physischer oder psychologischer Stress zu einer Ausschüttung von CRH (*engl.* corticotropin releasing hormone) im PVN (Kovacs, 1996; Owens, 1993). CRH bewirkt in der Hypophyse die Synthese von POMC (*engl.* proopiomelanocortin), das zu ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) prozessiert und in den peripheren Blutkreislauf

sezerniert wird. In der Nebennierenrinde induziert ACTH die Ausschüttung von Glucocorticoiden, die eine Reihe von physiologischen Effekten vermitteln. Die Sexualhormone wie Östrogene und Androgene, sowie Progesterone werden hingegen über die HPG-Achse (*engl.* Hypothalamus pituitary gonadal axis) reguliert. Hier wird die Sezernierung der Gonadotropine LH (lutenisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendem Hormon) in der Hypophyse durch das im Hypothalamus produzierte GnRH (*engl.* Gonadotropin releasing hormone) induziert. Die Gonadotropine bewirken in den Gonaden die Sezernierung der Hormone.

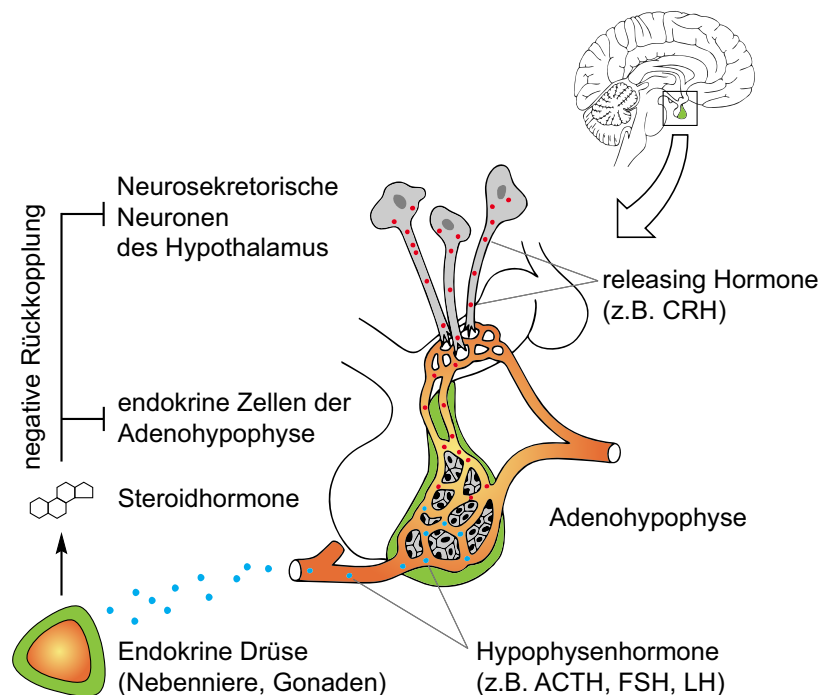


Abb. 1 Schematische Darstellung der Steroidhormonregulation

Die Produktion und Sekretion von Steroidhormonen wird durch einen Keislauf reguliert, der den Hypothalamus, die Hypophyse, sowie die endokrinen Drüsen umfasst. Neurosekretorische parvozelluläre Neuronen des hypothalamischen Nucleus paraventricularis sezernieren (*engl.*) *releasing* Hormone, welche in den endokrinen Zellen der Adenohypophyse die Sekretion von Hormonen stimulieren, die wiederum in einer endokrinen Drüse die Sekretion der Steroidhormone vermitteln. Diese Hormone kontrollieren über eine negative Rückkopplung die Aktivität dieser Achse. Verändert nach (Campbell, 1998).

1.1 Die durch Glucorticoide vermittelte Stressantwort

Die Aktivierung der HPA-Achse führt zu einer pulsierenden Ausschüttung von Glucocorticoiden, wie Cortisol bei Menschen und Primaten oder Corticosteron bei Nagetieren (Lightman, 2008). Glucocorticoide wirken regulatorisch auf den Energiemetabolismus, das

Immunsystem und verschiedene Entwicklungsprozesse. So erhöhen Glucocorticoide den Glukosespiegel im Blut, indem die Gluconeogenese, die Lipolyse und der Abbau von Skelettmuskeln stimuliert werden, während die Aufnahme von Glucose in Muskeln und Fettgewebe reduziert wird (Klinke, 1994). Zudem vermitteln Glucocorticoide eine Reduktion von Entzündungsprozessen (Webster, 2002). Studien an Mäusen mit einer Deletion des Glucocorticoidrezeptors (GR) zeigten zudem den Einfluss dieses Rezeptors auf die fötale Entwicklung (Cole, 1995; Ng, 2000). Klinische Studien deckten auf, dass viele psychiatrische, aber auch metabolische Erkrankungen mit Veränderungen der Konzentrationen des im Blut zirkulierenden Cortisols assoziiert sind (Evans, 2005). So wurden in depressiven Patienten dauerhaft erhöhte Cortisolkonzentrationen gemessen, die sich nach erfolgreicher Behandlung wieder normalisieren (Butler, 1968; Parker, 2003). In Patienten mit posttraumatischer Belastungsstörung werden im Gegensatz hierzu überwiegend verminderte Cortisolkonzentrationen gemessen (Yehuda, 2002). Der in Patienten mit Depressionen beobachtete Hypercortisolismus, manifestiert sich in vielen Fällen durch eine eingeschränkte Regulation der HPA-Achse. Diese Dysregulation kann durch verschiedene physiologische Veränderungen erklärt werden, wie einer verminderten negativen Rückkopplung durch Glucocorticoide (Holsboer, 2000), einer Hyperresponsivität der Nebennierenrinde auf ACTH (Parker, 2003), oder einer Hypersekretion von CRH (Nemeroff, 2002). Die durch die Aktivierung der HPA-Achse sezernierten Glucocorticoide binden im Gehirn an den Mineralocorticoidrezeptor (MR) und den GR. Der GR ist im gesamten Gehirn sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen exprimiert, wobei die höchste Expression im parvozellulären Nukleus Paraventricularis (PVN), in aminergen Neuronen und in speziellen Neuronen des limbischen Systems identifiziert wurde. Diese limbischen Neuronen projizieren in den PVN und modulieren dessen Funktion durch Freisetzung von inhibitorischen GABA (*engl.* γ -aminobutyric acid)-Transmittern (Herman, 2003; Miklos, 2002). Der MR hingegen ist überwiegend in Neuronen des limbischen Systems, wie dem Hippocampus, dem lateralen Septum und der Amygdala sowie in einigen corticalen Bereichen exprimiert (De Kloet, 1998). Interessanterweise wird eine Colokalisation des MR und des GR im Hippocampus in vielen Spezies beobachtet, was auf eine evolutionär konservierte Assoziation der Lokalisation dieser Rezeptoren schließen lässt (McEwen, 1986; Patel, 2000).

Der MR ist bereits bei niedrigen Corticosteronkonzentrationen aktiv, da dieser Rezeptor das Hormon mit höherer Affinität bindet als der GR (Reul, 1985). Hierdurch vermitteln die Glucocorticoide durch den MR zum einen die basale Aktivität der HPA-Achse und zum anderen erhalten sie die Responsivität der HPA-Achse bei einem Anstieg der

Glucocorticoidkonzentration. Hohe Glucocorticoidkonzentrationen aktivieren den GR, der die negative Rückkopplung der HPA-Achse und Mechanismen zur Wiederherstellung der Homöostase vermittelt (de Kloet, 1987). Andere Steroidhormone beeinflussen ebenfalls die Aktivität der HPA-Achse. So wurde gezeigt, dass in weiblichen Ratten eine erhöhte HPA-Achsenaktivität durch Progesteron und Östrogen vermittelt wird. Diese Steroidhormone modulieren den MR Einfluss auf die HPA-Achse in der Form, dass Östrogene eine Reduzierung hippocampaler mRNA des MR bewirken und Progesteron die Hormonbindungsaffinität des MR reduziert (Carey, 1995). Im Gegensatz dazu führen Androgene zu einer reduzierten HPA-Achsenaktivität (Viau, 2002).

Veränderungen in der Aktivität der HPA-Achse können einen Einfluss auf verschiedene kognitive Prozesse ausüben (de Kloet, 1999; Lupien, 2007; McEwen, 2007). So wurde gezeigt, dass Corticosteron die kognitive Fähigkeit verbessern kann, wenn es direkt nach einer Aufgabe verabreicht wurde, in der das räumliche Gedächtnis trainiert wurde (Sandi, 1997). Wurden die Tiere hingegen einem Stressor während der Aufgabe ausgesetzt, führte die zusätzliche Ausschüttung der Hormone zu einer Einschränkung des räumlichen Gedächtnisses (Diamond, 1996; Kim, 2002). Zudem fand man, dass chronischer Stress mit einem reduzierten Volumen des Hippocampus und weniger dendritischen Verzweigungen sowie einer verminderten kognitiven Leistung assoziiert ist (Lupien, 2009). Stress und Glucocorticoide modulieren ausserdem die Bildung und die Morphologie von dendritischen Spines und beeinflussen somit die synaptische Plastizität, die als physiologisches Korrelat für Gedächtnis und Lernprozesse angesehen wird (Chen, 2008; Radley, 2008).

1.2 Die Signaltransduktion von Steroidhormonen

Die physiologischen Effekte der Steroidhormone, wie beispielsweise die durch Glucocorticoide vermittelte negative Rückkopplung der HPA-Achse, werden durch Rezeptoren vermittelt, die durch die Hormone aktiviert werden. Diese, zu der Klasse der Kernrezeptoren zählenden Steroidhormonrezeptoren (SR), wirken als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren, welche differentiell die Expression verschiedener Gene regulieren (Mangelsdorf, 1995).

Der durch die Steroidhormone vermittelte Signaltransduktionsprozess kann auf vielfältige Weise reguliert werden: Die Konzentration an freiem Hormon im Blutkreislauf wird durch dessen Synthese bzw. Ausschüttung reguliert. Daneben kann die Verfügbarkeit der Hormone für das Zielgewebe auch durch die Expression von steroidbindendem Globulin (SBG), zum Beispiel dem corticosteroidbindenden Globulin (CBG) reguliert werden. So sind mehr als 95% des zirkulierenden Corticosterons in Nagetieren an CBG gebunden (Dallman,

1987). Obwohl klassische Modelle der Steroidhormonsignaltransduktion davon ausgehen, dass nur freie, nicht an Serumglobuline gebundene Steroidhormone biologisch zugänglich sind, lassen neuere Studien den Schluss zu, dass auch die im Serum an Globuline gebundene Steroide in signifikantem Ausmaß zur Vermittlung der steroidalen Effekte beitragen (Petersen, 2006).

Aufgrund ihrer Lipophilie können Steroidhormone frei durch die Zellmembran diffundieren, so dass sie an ihre intrazellulären Rezeptoren binden können. Neue Studien zeigen jedoch einen physiologischen Einfluss von membranassoziierten Rezeptoren bezüglich der zellulären Aufnahme von Steroidhormonen (Hammes, 2005). Zudem kann die Erreichbarkeit von hormonell wirkenden Liganden in das Gehirn durch Transporter aus der Klasse der MDR (*engl.* multi drug resistance) in der Blut-Hirn-Schranke beeinflusst werden (Schinkel, 1995). Diese Transporter beeinflussen auch die Effizienz von Medikamenten, wie beispielsweise Antidepressiva, die als Substrat des MDR1 identifiziert worden sind (Uhr, 2008).

Intrazellulär binden die Steroidhormone an Rezeptoren, die daraufhin mit spezifischen Sequenzen der DNA interagieren (hormonresponsive Elemente, HREs) und dadurch die Transkription verschiedener Zielgene sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Bei der als Transaktivierung bezeichneten positiven Modulation der Transkription spezifischer Zielgene rekrutiert der mit der DNA interagierende Rezeptor Transaktivatoren. Diese machen die Promoterregionen zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie, indem Chromatinstrukturen neu modelliert werden. Bei der Transrepression wird die Transkription der Zielgene negativ reguliert, indem monomere SR an andere als Aktivatoren wirkende Transkriptionsfaktoren binden (Beato, 1995; Malkoski, 1999). Die negative Regulation von Zielgenen kann zudem durch negative hormonresponsive Elemente (nHREs) vermittelt werden, an die SR als Monomere, Dimere oder Trimere binden können (Drouin, 1993; Malkoski, 1997; Radoja, 2000). Für die Transaktivierung binden die Rezeptoren als Dimere an die HREs, die typischerweise aus zwei Hexameren mit palindromischer Sequenz aufgebaut sind, die durch einen Spacer mit drei Basenpaaren voneinander getrennt sind (Strähle, 1987). Diese Sequenz wirkt nicht nur als Bindeglied des Rezeptors an die DNA, sondern auch als Ligand, wobei subtile Unterschiede in dem Motiv die Aktivität des Rezeptors beeinflussen können (Meijsing, 2009).

1.3 Die Regulation von Steroidhormonrezeptoren durch den Multichaperonheterokomplex

Steroidhormonrezeptoren (SR) bilden eine Gruppe innerhalb der Kernrezeptoren, deren Struktur sich in verschiedene Domänen gliedert. In dem mittleren Segment des Moleküls befindet sich die DNA-Bindungsdomäne (DBD), bestehend aus zwei konservierten Zinkfingern und einer variablen (*engl.*) Hinge-Region (Berg, 1989). Am C-terminus befindet sich die konservierte Ligandenbindungsdomäne (LBD), sowie ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), das für die Translokation des Rezeptors in den Nukleus notwendig ist (Mangelsdorf, 1995; Tsai, 1994). Der Rezeptor enthält zwei Aktivierungsdomänen, die unabhängig voneinander die Transkription beeinflussen können (Giguère, 1986; Truss, 1995). Die AF-1 (AF: *engl.* activation function) genannte Aktivierungsdomäne befindet sich am N-Terminus, die AF-2 Domäne am C-Terminus (Evans, 1988). Zu den SR gehören der Glucocorticoid- (GR), Mineralocorticoid- (MR), Progesteron- (PR), und Androgenrezeptor (AR), sowie der Östrogenrezeptor α (ER α) und Östrogenrezeptor β (ER β). Diese unterscheiden sich in ihrer LBD, DBD und den Aktivierungsdomänen, so dass jeder Rezeptor einerseits spezifische Affinitäten für unterschiedliche Liganden und andererseits für regulatorische Elemente der DNA besitzt, sowie verschiedene Coregulatoren rekrutiert. Die Spezifität der Rezeptoren für Liganden ist teilweise überlappend. So besitzen der GR und MR beide eine Spezifität für das Glucocorticoid Corticosteron, wobei der MR dieses Hormon mit einer 10-mal höheren Affinität bindet (Reul, 1985). Neben Glucocorticoiden wird der MR zusätzlich durch das Mineralocorticoid Aldosteron aktiviert (Gomez-Sanchez, 1997). Unter den SR zeigen der GR und MR die höchste Sequenzhomologie. Bezogen auf diese beiden Rezeptoren folgen der PR, AR und die ER in dieser Reihenfolge mit abnehmender Homologie (Mangelsdorf, 1995).

Für die Bindung des Hormons in der LBD muss sich die Konformation dieser Domäne so verändern, dass eine hydrophobe Tasche für das Hormon zugänglich wird (Gee, 2001). Die Reifung des Rezeptors zu einem Status, in dem das Hormon gebunden werden kann, erfolgt durch eine stufenweise Abfolge von Energie verbrauchenden Reaktionen, die durch einen aus Chaperonen und Cofaktoren bestehenden Heterokomplex vermittelt werden. Dieser auch *Foldosom* genannte Heterokomplex benötigt für eine effiziente Reifung des Rezeptors *in vitro* mindestens die Hitzeschockproteine Hsp90, Hsp70 und Hsp40, sowie das (*engl.*) Hsp organizing protein (Hop) und p23 (Dittmar, 1998; Kosano, 1998).

Hsp90, Hsp70 und Hsp40 gehören zu den molekularen Chaperonen, die als Hilfsproteine die korrekte Faltung anderer Proteine unterstützen und bei erhöhten zellulären

Stressbedingungen (z.B. Temperaturstress) Fehlfaltungen reduzieren (Hartl, 2002). Hsp90 ist hoch konserviert und das abundanteste Protein in Bakterien, Hefen und mehrzelligen Organismen (Pratt, 1997). Für die durch Hsp90 und andere Chaperone vermittelte Konformationsänderung in den als Substrat oder Klient bezeichneten Proteinen ist die Hydrolyse von ATP durch die intrinsische ATPase der Chaperone notwendig. In der Struktur von Hsp90 können folgende Elemente unterschieden werden: Die N-terminale Domäne mit einer ATPase Aktivität ist durch einen variablen Linker von dem mittleren Segment getrennt, in dem die Klienten gebunden werden. Am C-Terminus befindet sich die Dimerisierungsdomäne, in der sich zudem ein Strukturmotiv mit der Aminosäuresequenz MEEVD für die Interaktion mit Cofaktoren befindet (Pearl, 2006). Hsp90 faltet neben Transkriptionsfaktoren und Kinasen eine Vielzahl anderer Klienten, wobei die molekularen Mechanismen der Faltung von SR am besten untersucht worden sind (Pratt, 2003).

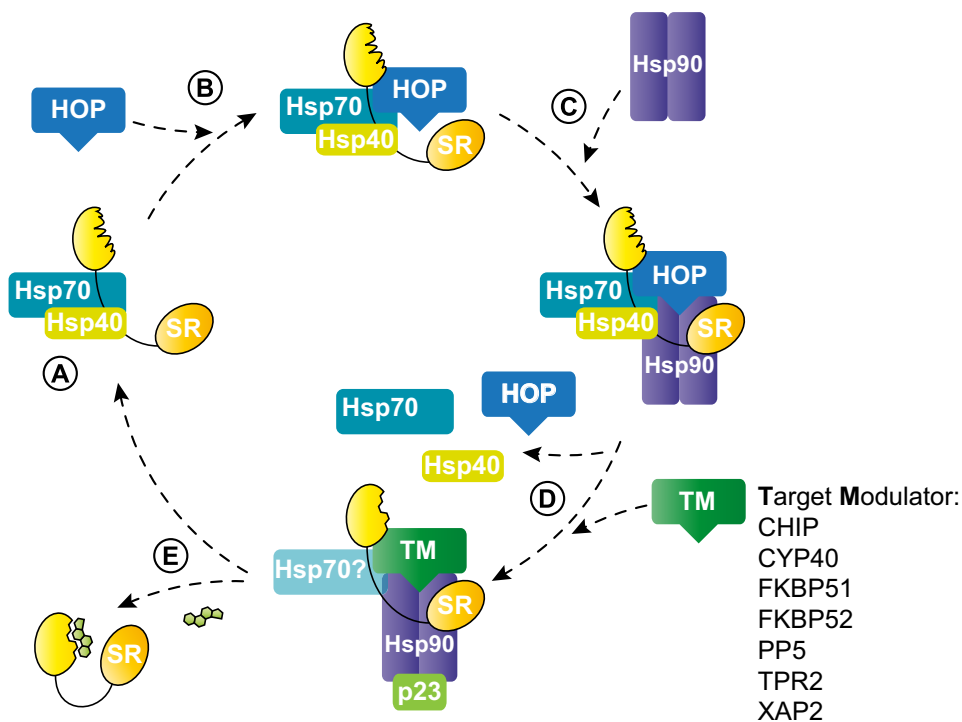


Abb. 2 Schematische Darstellung der SR Faltung im Multichaperon-heterokomplex

Die Steroidhormonrezeptoren (SR) durchlaufen einen Kreislauf, in dem die LBD des SR zu einer hormonaffinen Struktur gefaltet wird (siehe Kapitel 1.3 für Details). Die Effizienz des Schrittes zum hochaffinen Rezeptor kann durch einen „Target Modulator“ (TM) verändert werden, der über seine TPR-Domäne mit dem Heterokomplex interagiert.

Die Bindung eines SR mit dem Multichaperonheterokomplex wird durch Interaktionen mit Hsp70 und Hsp40 initiiert (Abb. 2, A). Hierbei stimuliert Hsp40 die ATP-Hydrolyse durch Hsp70, die für die Interaktion mit dem Rezeptor notwendig ist (Morishima, 2000). Dieser Rezeptor-Hsp70-Komplex bindet Hop (Abb. 2, B), das durch zwei TPR-Domänen sowohl Hsp70 als auch Hsp90 binden kann und somit die Integration eines Hsp90-Dimer in den Heterokomplex vermittelt (Abb. 2, C) (Dittmar, 1997; Scheufler, 2000). Da Hop präferentiell mit der ADP gebundenen Konformation von Hsp90 interagiert (Johnson, 1998) und Hsp90-ADP eine hohe Affinität für hydrophobe Substrate besitzt (Grenert, 1997; Sullivan, 1997), wird vermutet, dass Hsp90-ADP in den Komplex integriert wird, indem die hydrophoben Reste der LBD des Rezeptors teilweise exponiert sind. Während der Öffnung der Hormon bindenden Tasche in der LBD, verändert sich die Hsp90 Konformation zu der an ATP gebundenen Form, die durch p23 stabilisiert wird (Smith, 1998). In diesem Zustand verlässt Hop vermutlich zusammen mit Hsp70 den Komplex und wird durch einen so genannten (*engl.*) Targetmodulator (TM) ersetzt (Abb. 2, D). Dieser enthält eine oder mehrere Domänen, die aus TPR (*engl.* tetratricopeptide repeat)-Motiven konstruiert sind. Die Konsensussequenz dieses Motivs besteht aus 34 Aminosäuren und bildet durch antiparallele α -Helices eine Furche, in der konservierte Aminosäurereste die Interaktion mit dem EEVD Tetrapeptid von Hsp90 oder Hsp70 vermitteln (Scheufler, 2000). Durch diese Protein-Interaktionen konkurrieren verschiedene Targetmodulatoren um die Inkorporation in den Hsp70/Hsp90-Heterokomplex. Die im Folgenden auch als TPR-Proteine bezeichneten Targetmodulatoren umfassen zum Beispiel CHIP (*engl.* C-terminus of Hsc70 interacting protein), Cyp40 (Cyclophilin 40), FKBP51 (*engl.* FK506 binding protein 51), FKBP52 (*engl.* FK506 binding protein 52), PP5 (Protein Phosphatase 5), TPR2 (*engl.* J-domain containing cochaperone) und XAP2 (*engl.* Hepatitis virus B X-associated protein 2). Man geht davon aus, dass die Aktivität eines Faltungskomplexes durch die Anwesenheit eines TPR-Proteins moduliert werden kann. Somit wird die Aktivität des Rezeptors durch die relative Abundanz der einzelnen TPR-Proteine oder anderer, den Faltungskreislauf beeinflussender Faktoren moduliert. Sobald im weiteren Verlauf der Rezeptoraktivierung ein Hormon an den Rezeptor bindet, wird eine Konformationsänderung induziert, die das NLS demaskiert und somit die Translokation des Rezeptors in den Nukleus induziert (Abb. 2, E). Diese Konformationsänderung führt zu intramolekularen Interaktionen zwischen der C-terminalen LBD und der N-terminalen Aktivierungsdomäne und im Weiteren zu einer Dimerisierung des Rezeptors, die vermutlich im Nukleus stattfindet (Schäufele, 2005). Es wurde ausserdem gefunden, dass der SR-Heterokomplex mit dem Motorprotein Dynein interagiert, welches den

retrograden Transport entlang der Mikrotubulifilamente vermittelt (Silverstein, 1999). Welche physiologische Relevanz diese Interaktion für die Rezeptoraktivität besitzt ist nicht vollständig geklärt, da nach Zerstörung der Mikrotubulifilamente mit Nocodazol immer noch eine Translokation des Rezeptors in den Nukleus, wenn auch mit verminderter Geschwindigkeit, beobachtet wird (Galigniana, 1998). Jedoch wurde gezeigt, dass die Translokation abhängig von der Hsp90-ATPase ist (Czar, 1997). Die Dynein-Interaktion wird durch eine PPIase (Peptidyl-Prolyl-Isomerase) Domäne bzw. der PPIase homologen Domäne in verschiedenen TPR-Proteinen, wie Cyp40, FKBP51, FKBP52 und PP5 vermittelt (Galigniana, 2002). Die PPIase katalysiert die cis/trans-Isomerisierungen von Peptidyl-Prolyl-Bindungen in einer Aminosäurekette (Lilie, 1993). Man konnte jedoch zeigen, dass diese katalytische Aktivität für die Modulation der Rezeptoraktivität durch FKBP51 oder FKBP52 nicht notwendig ist (Riggs, 2007). Ein Beispiel für die physiologische Relevanz der TPR-Proteine zeigt ein humaner Polymorphismus in dem Gen für FKBP51. Dieser beeinflusste nicht nur das Expressionslevel von FKBP51, sondern zeigte zudem einen Einfluss auf das Ansprechen bei einer Therapie mit Antidepressiva (Binder, 2004). Neuere Studien unterstützen die Bedeutung von FKBP51 in Bezug auf affektive Erkrankungen, da diese nicht nur die Assoziationen zu bipolaren Erkrankungen bestätigt haben, sondern zudem Assoziationen für das Risiko, an einer posttraumatischer Belastungsstörung zu erkranken, gezeigt haben (Binder, 2008; Lekman, 2008; Willour, 2008).

1.4 TU3A ist ein stressreguliertes Gen

Viele der durch Stress ausgelösten physiologischen Effekte, die in einem veränderten Verhalten eines Lebewesens resultieren können, werden durch Veränderungen des zellulären Expressionsprofils vermittelt. So benötigen beispielsweise die durch den GR vermittelten Effekte auf elektrophysiologische Parameter in hippocampalen Neuronen eine *de novo* Proteinsynthese (Karst, 1991; Kerr, 1992). Für die Erforschung von Krankheiten, die mit einer Dysregulation der durch Steroidhormone vermittelten Signaltransduktion assoziiert sind, ist somit neben den zuvor beschriebenen Regulationsmechanismen, welche die Aktivität der SR modulieren, zudem ein umfassendes Verständnis der durch den aktivierten Rezeptor ausgelösten zellulären Stressantwort notwendig. Das Verständnis dieser zellulären Prozesse kann als Grundlage für die mechanistische Aufklärung der physiologischen Stressantwort dienen. Da der GR als Transkriptionsfaktor das zelluläre Expressionsprofil verändert, kann die detaillierte Untersuchung von durch Stress regulierten Genen wertvolle Informationen darüber generieren, welche nachgeschalteten Prozesse in der physiologischen Stressantwort moduliert werden.

Das Gen TU3A (DRR1, FAM107A) wurde in einer Transkriptionsanalyse aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Marianne Müller (Molekulare Stressphysiologie, MPI für Psychiatrie) als reguliertes Gen nach maternaler Deprivation identifiziert (Liebl, 2009). Maternale Deprivation verursacht eine starke Aktivierung der HPA-Achse und wird häufig als Modell für frühen traumatischen Stress verwendet (Levine, 2001; Schmidt, 2004). Im Rahmen einer kollaborativen Studie mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Marianne Müller wurden mittels *in situ* Hybridisierungen nach Stressexposition erhöhte Spiegel an TU3A mRNA im PVN, in der Amygdala und im Cortex gezeigt. Eine basale Expression von TU3A wurde im Cortex, in der hippocampalen CA3-Region, im Septum und im Cerebellum identifiziert. Dabei wird TU3A am stärksten im Cerebellum exprimiert. Die Regulation von TU3A wird durch den GR vermittelt, da die Injektion des synthetischen Glucocorticoids und spezifischen GR-Agonisten Dexamethason eine verstärkte Expression von TU3A vermittelt, die durch den GR-Antagonisten RU486 aufgehoben werden konnte. Zudem wurden in der Promoterregion von TU3A funktionelle GREs identifiziert. Die durch Viren vermittelte ektopische Überexpression von TU3A im murinen Hippocampus führte zu einer Verbesserung von kognitiven Leistungen und zu einer Verminderung von Verhaltensmustern in der Maus, die mit depressiven Verstimmungen beim Menschen assoziiert werden. Darüber hinaus wurden in diesen Mäusen Veränderungen in der synaptischen Reizweiterleitung durch elektrophysiologische Messungen in der Arbeitsgruppe von Dr. Mathias Eder (Dynamik neuronaler Netzwerke, MPI für Psychiatrie) identifiziert. Die oben beschriebenen Ergebnisse sind zur Veröffentlichung vorbereitet.

Die molekulare Funktion des TU3A-Proteins wurde bisher nicht untersucht. Das Gen wurde zuerst als mutmaßliches Tumorsupressorgen durch eine verminderte Expression in Nierenzellkarzinomen und verschiedenen anderen Zelllinien identifiziert (Kholodnyuk, 2006; Wang, 2000; Yamato, 1999). Es wurde publiziert, dass die Überexpression von TU3A das Wachstum von TU3A-negativen Zelllinien reduziert (Wang, 2000; Zhao, 2007). Die verminderte Expression in diesen Karzinomzellen ist vermutlich durch epigenetische Mechanismen reguliert (Awakura, 2008; van den Boom, 2006). Interessanterweise wurde vor kurzem gezeigt, dass die TU3A-Expression in *post mortem* Gewebe des dorsolateralen präfrontalen Cortex (Brodmann area 46) bei Patienten mit Schizophrenie und bipolaren Störungen signifikant erhöht ist (Shao, 2008).

1.5 Zielsetzung

Steroidhormone regulieren eine Vielzahl von physiologischen Prozessen und können Veränderungen in der Stimmung und dem Verhalten eines Lebewesens bewirken. Die Wirkweise dieser Hormone in dem jeweiligen Zielgewebe unterliegt einem komplexen Regulationsgefüge, dessen molekulare Details noch nicht ausreichend untersucht worden sind. Hierbei sind sowohl die Mechanismen, welche die Aktivität der SR beeinflussen, als auch die molekularen Effekte, die durch die Aktivität der SR verursacht werden, von besonderem Interesse. Zielsetzung des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der zellulären Regulation von SR durch den Hsp70/Hsp90-Multichaperon-heterokomplex. Hier sollten speziell die Effekte von TPR-Proteinen untersucht werden, die als Targetmodulatoren die Aktivität von SR beeinflussen können. Bisherige Studien zur Funktion der TPR-Proteine haben bislang nur einzelne Faktoren oder Rezeptoren in unterschiedlichen zellulären Systemen untersucht, wobei die in diesen Studien identifizierten Effekte teilweise konträr interpretiert wurden. In dieser Arbeit sollten daher die Effekte von verschiedenen TPR-Proteinen auf die SR in einem zellulären System umfassend untereinander verglichen werden.

Da SR als Transkriptionsfaktoren wirken, kann die Analyse des zellulären Expressionsprofils Aufschluss über die durch Steroidhormone verursachten molekularen Effekte geben. TU3A wurde als ein durch Stress reguliertes Gen identifiziert. Da die molekulare Funktion des TU3A Genprodukts nicht bekannt war, sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die molekulare Funktion von TU3A näher untersucht werden. Durch diese Analyse sollten Rückschlüsse auf die durch Stress verursachten zellulären Effekte und deren molekularen Mechanismen gezogen werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Name	Bezugsquelle
Acrylamidlösung	Serva (Heidelberg)
Adenosin 5'-Triphosphat	Sigma (USA)
Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose SeaKem	Biozym (Oldendorf)
Aktivkohle	Sigma (USA)
Albumin bovine	Sigma (USA)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Antibiotic-Antimycotic (100x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA	Sigma (USA)
Coelenterazine	PJK (Kleinblittersdorf)
Comassie Brilliant Blue G	Sigma (USA)
Comassie Serva Blue R	Serva (Heidelberg)
Cortisol (17-Hydroxycorticosteron)	Sigma (USA)
DAPI	Sigma (USA)
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	PEQLAB (Erlangen)
Dexamethason	Sigma (USA)
Dextran T70	Roth (Karlsruhe)
DMEM w/o Phenol red	Invitrogen (Karlsruhe)
DMSO	Sigma (USA)
DTT (1,4-Dithiotreitol)	Roth (Karlsruhe)
ECL-Westernblot-Detektionssystem	Millipore (USA)
EDTA	Sigma (USA)
Ethidiumbromid	Sigma (USA)
Fludrocortisone Acetat	Sigma (USA)
Fötale Kälber-Serum (FBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Gelatine	Sigma (USA)
Hefe-Extrakt	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	PEQLAB (Erlangen)

Materialien

Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Kodak GBX Developer	Sigma (USA)
Kodak GBX Fixer	Sigma (USA)
Low melting Agarose	Bio-Rad (München)
D-Luciferin	PJK (Kleinblittersdorf)
poly-D-Lysine	Sigma (USA)
Methylcellulose (4000 centipose)	Sigma (USA)
Milchpulver Rapidlait	Migros (Schweiz)
MOPS	Roth (Karlsruhe)
MTT	Sigma (USA)
poly-Ornithine	Sigma (USA)
PBS 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
Phalloidin-Cy3	Cytoskeleton (USA)
Phalloidin-Alexa546	Invitrogen (Karlsruhe)
PeqGold Protein-Marker IV	Peqlab (Erlangen)
ProLong Gold Antifade (Eindeckmedium)	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma (USA)
Proteaseinhibitor-Cocktail w/o EDTA	Sigma (USA)
Ribonuclease	Sigma (USA)
RNASE FREE	CLP (Grossbritannien)
Rnasin	Promega (Mannheim)
Sodium dodecylsulfat (SDS)	Fluka (Buchs)
Sodium Pyruvat 100x	Invitrogen (Karlsruhe)
Staurosporine	Bioaustralis
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylendiamin)	Roth (Karlsruhe)
Tetracyclin	Invitrogen (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Riedel-de Haen (Seelze)
Triton X-100	Sigma (USA)
Trypsin-EDTA Solution 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
TWEEN20	Sigma (USA)
X-Gal	PEQLAB (Erlangen)
Xylencyanol	Sigma (USA)
Weitere, hier nicht vermerkte Chemikalien stammten von Merck (Darmstadt)	

2.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Elektroporationsküvetten	Biorad (München)
Faltenfilter	Schleicher und Schuell (Dassel)
Filterpapier 3 MM Whatman	Schleicher und Schuell (Dassel)
Filtersäulen Vivabiospin (5 kDa cutoff)	Sartorius (Goettingen)
Filtersäulen YM-50 (50 kDa cutoff)	Millipore (USA)
Luminometerplatte 96 well	Nalgene Nunc International (USA)
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell (Dassel)
Objekträger	Roth (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Peske (Aindling)
Reaktionsgefäße 1,5 ml, Safelock	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Röntgenfilme	Fujifilm (Düsseldorf)
Sterilfilter Top Bottle Filter	Nalgene Nunc International (USA)
Zellkulturplastikware	TPP (Schweiz)
Zentrifugationsröhrchen 50 ml, 15 ml	TPP (Schweiz)
Zentrifugationsröhrchen für die UZ	Beckman (Krefeld)

2.3 Geräte

Name	Bezugsquelle
Begasungsbrutschrank	Heraeus (Mannheim)
Begasungsbrutschrank	Binder (Tuttlingen)
Densitometrie Scanner GS-800	Biorad (München)
Elektrophoresezubehör	Biorad (München)
Elektroporationsgerät, Gene Pulser II	Biorad (München)
Eletroporationsgerät, Nucleofector II	Amaxa (Köln)
Feinwaage Voyager 50228	Ohaus (Giessen)
Fluorometer Genios Pro	Tecan (Schweiz)
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikroplattenreader MR 7000	Dynatech (Denkendorf)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Luminometer Viktor2 Multilabel Counter	Wallac (Finnland)
Luminometer Tristar	Berthold (Bad Wildbad)
Gefrierschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Gelträger Agarosegele	Biorad (München)
pH-Meter	WTW (Weilheim)
Power-Pac 400	Biorad (München)
Reinstwasseranlage PureLab ultra	Labtech (Wohlen)
Spektrophotometer DU 640	Beckman (Krefeld)
Sonifikator, Cell Disruptor B15	Branson (USA)
Thermocycler Primus 25	Peqlab (Erlangen)
Thermocycler TGradient	Biometra (Göttingen)
Thermomixer compact	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Überkopf-Schüttler Rotamix	ELMI (Lettland)
UV-Transilluminator	Stratagene (Amsterdam)
UV-Transilluminator , GelDoc	Biorad (München)
Vortexer MS2	IKA Labortechnik (Staufen)
Waage Voyager 50187	Ohaus (Giessen)
Wasserbad	G. für Labortechnik (Burgwedel)

Mikroskope

Axioplan 2	Carl Zeiss (Jena)
CK30	Olympus (Hamburg)
IX50	Olympus (Hamburg)
LSM 510 META NLO	Carl Zeiss (Jena)
LSM FV1000	Olympus (Hamburg)

Zentrifugen

Allegra 21	Beckman (Krefeld)
Allegra X-22R	Beckman (Krefeld)
Biofuge pico	Heraeus (Mannheim)
J2 MC (Rotor JA-14)	Beckman (Krefeld)
Kühlzentrifuge (5417 R)	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Kühlzentrifuge (5804 R)	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Omifuge 2.0 RS	Heraeus (Mannheim)
Ultrazentrifuge LB-70M (Rotor: SW 60 Ti)	Beckman (Krefeld)
Vakuumentrifuge Speedvac	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Varifuge 3.0R	Heraeus (Mannheim)

2.4 Kits und weitere Materialien

Name	Bezugsquelle
2D Quant-Kit	Amersham (Freiburg)
Basic Neuron SCN Nucleofector Kit	Amara (Köln)
Amylose-Agarose	NEB (Frankfurt am Main)
BCA-Kit	Pierce (Bonn)
Entwickler GBX	Kodak (USA)
ExGene 500 (Polyethylenimin)	Fermentas (St. Leon-Rot)
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit	Peqlab (Erlangen)
ECL Detektionssystem	Millipore (USA)
Fixierer GBX	Kodak (USA)
HA-Agarose Resin	Sigma (USA)
HisTrap HP Agarose 1 ml	GE Healthcare (USA)
M2-FLAG Agarose Resin	Sigma (USA)

EZ-PCR Mycoplasma test kit	Biological Industries (Israel)
Nucleobon AX Plasmid Megaprep Kit	Macherey-Nagel (Düren)
PD-10 Desalting (Sephadex) Column	GE Healthcare (USA)
PeqGold DNA-Leiter Mix	Peqlab (Erlangen)
Ponceau	Serva (Heidelberg)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma (USA)
Protease Inhibitor Cocktail w/o EDTA	Sigma (USA)
Proteinmarker BenchMark	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinmarker PeqGold Prestained IV	Peqlab (Erlangen)
PureLink HiPure Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
QIAquick Gel Extraction kit	Quiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Quiagen (Hilden)

2.5 Lösungen und Nährmedien

Name	Bezugsquelle
10x Antibiotikum-Antimykotikum	Invitrogen (Karlsruhe)
10x EBSS	Invitrogen (Karlsruhe)
1x GAB (General Actin buffer)	Cytoskeleton (USA)
10x FAB (F-Actin buffer)	Cytoskeleton (USA)
10x Natrium-Pyruvat	Invitrogen (Karlsruhe)
10x PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Fetal bovine serum (FBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Gentamycin	Invitrogen (Karlsruhe)
Horse serum (HS)	Invitrogen (Karlsruhe)
LB-Medium	Sigma (USA)
Neurobasal A (NBA) Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
ProLong Gold Antifade (Einbettmedium)	Invitrogen (Karlsruhe)
SOC-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Steroidfreies FBS	siehe Kapitel 3.4.1

2.6 Enzyme und Proteine

Name	Bezugsquelle
β -Aktin (aus humanen Blutplättchen)	Cytoskeleton (USA)
Catalase	Sigma (USA)
FaktorXa Protease	NEB (Frankfurt am Main)
FLAG-BAP (bakterielle alkalische Phosphatase)	Sigma (USA)
FLAG-Peptide	Sigma (USA)
Glucose Oxidase	Sigma (USA)
HA-Peptide	Sigma (USA)
Pfu DNA-Polymerase	Stratagene (USA)
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Pyren- α -Aktin (aus Hasenmuskel)	Cytoskeleton (USA)
Restriktionsendonucleasen	NEB (Frankfurt am Main)
Reverse Transkriptase (RT)	NEB (Frankfurt am Main)
T4-DNA Ligase	NEB (Frankfurt am Main)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)

2.7 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5 α	F- Φ 80LacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r k-;m r+) phoA supE44 thi-1gyrA96relA1
BL21(DE3)pLysS	E.coli B F- dcm ompT hsdS(r B-;m B-) gal β (DE3)[pLysS Cam ^r]

2.8 Zelllinien

Name	ATCC Katalog #	Zelltyp
HEK-293	CRL-1573	humane Nierenzellen
HeLa	CCL-2	humane Cervixkarzinomzellen
Neuro2a (N2a)	CCL-131	murine Neuroblastomzellen
NIH-3T3	CRL-1658	murine Fibroblastenzellen
SK-N-MC	HTB-10	humane Neuroepitheliumzellen

2.9 Antikörper

Primäre Antikörper

Name	Isotyp	Bezugsquelle
Aktin (I-19)	goat IgG	Santa Cruz (USA)
Anti-HA-HRP (3F10)	rat IgG	Roche (Mannheim)
Anti-FLAG-M2-HRP	mouse IgG	Sigma (USA)
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	rabbit IgG	Cell Signaling (USA)
Anti-Hsp90 (H-114)	rabbit IgG	Santa Cruz (USA)
Anti-Hsp70 (W27)	mouse IgG	Santa Cruz (USA)
Anti-FKBP59 (FKBP52)	mouse IgG	Stressgen (USA)
Anti-Prx1 (N-14)	goat IgG	Santa Cruz (USA)
Anti-PrxI PAb	rabbit IgG	Alexis (USA)
Anti-p23	mouse IgG	ABR (USA)
Anti-GFP (B-2)	mouse IgG	Santa Cruz (USA)
Anti-MAP2 (AP-20)	mouse IgG	Sigma (USA)
Anti-NFH	chicken IgY	Chemicon/Millipore (USA)
Anti-TU3A	rabbit IgG	Biogenes (s. Kapitel 4.2.4)

Sekundäre Antikörper

Name	Isotyp	Bezugsquelle
Anti-chicken-Cy3	donkey IgG	Dianova (Hamburg)
Anti-goat-HRP	bovine IgG	Santa Cruz (USA)
Anti-mouse-Alexa546	goat IgG	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-mouse-Alexa488	goat IgG	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-mouse-HRP	goat IgG	Pierce (Bonn)
Anti-mouse-HRP	goat IgG	Sigma (USA)
Anti-rabbit-Alexa488	goat IgG	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-rabbit-Alexa546	goat IgG	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-rabbit-Alexa647	goat IgG	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-rabbit-HRP	goat IgG	Pierce (Bonn)
Anti-rabbit-HRP	goat IgG	Sigma (USA)
Anti-rabbit-HRP	donkey IgG	Dianova (Hamburg)

2.10 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
ER1-HA-Start-XhoI	GCTGTCTCGAGGCCACCATGATCCTTATCCTTATGATGTACCTGATTATGGGACCATGACCCTCCACA	5'-Primer für ER α zum Einfügen von C-terminalem HA; Schnittstelle für XhoI
ER1-Stop-BamHI	AAGCGTGGATCCGTTCTGTCTCAGACCCTGGCAGGGAAA	3'-Primer für ER α ; Schnittstelle für BamHI
ER2-HA-Start-XhoI	GCTATGCTCGAGGCCACCATTGATCCTTATCCTTATGATGTACCTGATTATCCGGATATAAAAACTCACCATC	5'-Primer für ER β zum Einfügen von C-terminalem HA; Schnittstelle für XhoI
ER2-Stop-NotI	TTGGAGCGGGCCGGACACGTCACCTGAGACTGTGG	3'-Primer für ER β ; Schnittstelle für NotI
PP5-WT-EcoRI-For	CAGAAATTCGCCATGGCGATGGCCGAAAGCGAACGTAAGTGTGC	5'-Primer für PP5; Schnittstelle für EcoRI
PP5-FLAG-EcoRI-For	TCAGAAATTCGCCATGGACTACAAGGACGACG	5'-Primer für PP5-FLAG; Schnittstelle für EcoRI
PP5-WT-NotI-Rev	TGGCGCCGCTCACATCAATT	3'-Primer für PP5; Schnittstelle für NotI
PP5-E76A-For	CTGCGCACCCGGTGGTATGGGTAT	5'-Primer zum Einfügen von E76A Mutation für PP5 mittels PCR-Ligation
PP5-E76A-Rev	ATAGCCATAGCACGCGGTGCGCAG	3'-Primer zum Einfügen von E76A Mutation für PP5 mittels PCR-Ligation
PP5ratmut3-Rev	TCCAGATCTGGTTCACTGTGTCCTCGGCTCGCCTC	3'-Primer zum Einfügen von H304A Mutation für PP5 mittels PCR; Schnittstelle BglII
TU3A-XhoI-For	TGCCCTCCGAGCCCTCCATGTACTCAGAGA	5'-Primer für TU3A; Schnittstelle für XhoI
TU3A-HindIII-Rev	GGCAGAAGCTTGATGGAGGGAGCTCTACAG	3'-Primer für TU3A; Schnittstelle für HindIII
TU3A-FLAG-HindIII-Rev	GCAGAAGCTTGCTCACTTGTCATCGTCTGTTGTAAGTCCAGTGTCTTTCCCTCGCTGGT	3'-Primer für TU3A zum Einfügen von C-terminalem FLAG; Schnittstelle für HindIII
GausEx-XhoI-For	GGCTCGAGCCACCATTGGGAGTCAAAGTTC	5'-Primer für Gausia mit N-Terminalem Exkretionssignal; Schnittstelle für XhoI
GausKDEL-HindIII-Rev	GGCGAAGCTTATTACAGTTCGTTCTTTGTCCACCACCGGCCCTTGATCTTG	3'-Primer für Gausia zum Einfügen von C-terminaler KDEL Sequenz; Schnittstelle für HindIII

2.11 Plasmide

Name	Eigenschaften	Strategie/Bezugquelle	Vektor-Rückgrat
pRK5-SV40-Pur-MC	Klonierungsvektor für die Expression von Proteinen in Säugetierzellen unter Kontrolle des humanen CMV-Promotors	Plasmid erhalten von G. Wochnik	pRK5-SV40-Pur-MC
pEGFP-C1	Klonierungsvektor für die Expression von Proteinen mit N-terminalem GFP in Säugetierzellen	Clontech (USA)	pEGFP-C1
pcDNA4+TO	Klonierungsvektor für die induzierbare Expression von Proteinen in Säugetierzellen	Invitrogen (Karlsruhe)	pcDNA4+TO
pcDNA6-TR	Expression des durch Tetrazyklin dereprimierbaren Transrepressors	Invitrogen (Karlsruhe)	pcDNA6-TR
pMAL-CR1	Klonierungsvektor für die Expression von Proteinen mit N-terminalem MBP in prokaryotischen Zellen	NEB (Frankfurt am Main)	pMAL-CR1
MMTV-Luc	Reporterplasmid für die Expression von Firefly Luciferase unter Kontrolle des MMTV-Promotors, induzierbar durch GR, MR, PR, AR	Hollenberg und Evans, 1988	
ERE-Luc	Reporterplasmid für die Expression von Firefly Luciferase unter Kontrolle Promotors der EREs enthält, induzierbar durch ER α , ER β	Plasmid erhalten von C. Behl	
Gaussia-KDEL	Expression von Gaussia Luciferase mit N-terminalem Exkretionssignal und C-Terminaler KDEL Sequenz (Endoplasmatic retention signal)	Amplifiziert mit GausEx-Xhol-For und GausKDEL-HindIII-Rev von pcDNA3.1-Gaussia-Ex	pRK5-SV40-Pur-MC
GR-HA	Expression von humanem GR mit N-terminalem HA-Epitop unter Kontrolle des SV40-Promotors	Plasmid erhalten von D. Spengler	pRK7
MR-HA	Expression von humanem MR mit N-terminalem HA-Epitop unter Kontrolle des SV40-Promotors	Plasmid erhalten von D. Spengler	pRK7
GFP-MR	Expression von humanem MR mit N-terminalem EGFP unter Kontrolle des CMV-Promotors	Plasmid erhalten von O. Almeida und T. Michaelidis	pEGFP-C1
PR-HA	Expression von humanem PR mit N-terminalem HA-Epitop unter Kontrolle des SV40-Promotors	Plasmid erhalten von D. Spengler	pRK7

Name	Eigenschaften	Strategie/Bezugsquelle	Vektor-Rückgrat
AR-HA	Expression von humanem AR mit N-terminalem HA-Epitop unter Kontrolle des SV40-Promotors	Plasmid erhalten von D. Spengler	pRK7
ER α -HA	Expression von humanem ER α mit N-terminalem HA-Epitop unter Kontrolle des SV40-Promotors	Plasmid erhalten von C. Behl, subkloniert in pRK5-SV40 mit ER1-HA-Start-XhoI und ER1-Stop-BamHI	pRK5-SV40-Pur-MC
ER β -HA	Expression von humanem ER β mit N-terminalem HA-Epitop unter Kontrolle des SV40-Promotors	Plasmid erhalten von C. Behl, subkloniert in pRK5-SV40 mit ER2-HA-Start-XhoI und ER2-Stop-NotI	pRK5-SV40-Pur-MC
CHIP-FLAG	Expression von CHIP mit C-terminalem FLAG	Plasmid erhalten von I. Lang-Rollin	pRK5-SV40-Pur-MC
Cyp40-FLAG	Expression von Cyp40 mit C-terminalem FLAG	Plasmid erhalten von R. L. Morimoto subkloniert in pRK5-SV40	pRK5-SV40-Pur-MC
FKBP51-FLAG	Expression von FKBP51 mit C-terminalem FLAG	Plasmid erhalten von G. Wochnik	pRK5-SV40-Pur-MC
FKBP52-FLAG	Expression von FKBP52 mit C-terminalem FLAG	Plasmid erhalten von G. Wochnik	pRK5-SV40-Pur-MC
FKBP52	Expression von FKBP52	Plasmid erhalten von G. Wochnik	pRK5-SV40-Pur-MC
TPR2-FLAG	Expression von TPR2 mit C-terminalem FLAG	Plasmid erhalten von M. Hayer-Hartl	pRK5-SV40-Pur-MC
XAP2-FLAG	Expression von XAP2 mit C-terminalem FLAG	Plasmid erhalten von I. Pongratz subkloniert in pRK5-SV40	pRK5-SV40-Pur-MC
PP5-WT-FLAG (pRK5)	Expression von PP5 mit N-terminalem FLAG	Amplifiziert mit PP5-FLAG-EcoRI-For und PP5-WT-NotI-Rev von PP5-WT-pCMV6	pRK5-SV40-Pur-MC
PP5-WT-FLAG (pCMV6)	Expression von PP5 mit N-terminalem FLAG	Plasmid erhalten von M. Chinkers	pCMV6

Name	Eigenschaften	Strategie/Bezugquelle	Vektor-Rückgrat
PP5-TPR (pCMV6)	Expression von PP5 mit mutierter TPR-Domäne zum Aufheben der Hsp90 Interaktion (Russel <i>et al.</i> , 1999)	Erstellt von Anna Laenger	pCMV6
PP5-R101A-FLAG	Expression von PP5 mit mutierter TPR-Domäne zum Aufheben der Hsp90 Interaktion (Russel <i>et al.</i> , 1999) und N-terminalen FLAG	Amplifiziert mit PP5-FLAG-EcoRI-For und PP5-WT-NotI-Rev von PP5-TPR (pCMV6)	pRK5-SV40-Pur-MC
PP5-E76A-FLAG	Expression von PP5 mit mutierter TPR-Domäne für höhere Phosphatase-Aktivität (Kang <i>et al.</i> , 2001) und N-terminalen FLAG	PCR-Ligation mit PP5-E76A-For und PP5-WT-NotI-Rev, PP5-FLAG-EcoRI-For und PP5-E76A-Rev	pRK5-SV40-Pur-MC
PP5-H304A-FLAG	Expression von PP5 mit mutierter Phosphatase Domäne zum Aufheben der Phosphatase Aktivität (Borthwick <i>et al.</i> , 2001)	PCR mit PP5-FLAG-EcoRI-For und PP5ratmut3-Rev, Ligation über EcoRI und BglII in PP5-WT-FLAG (pRK5)	pRK5-SV40-Pur-MC
TU3A	Expression von murinem TU3A	Amplifiziert mit TU3A-XhoI-F or und TU3A-HindIII-Rev von muriner Cerebellum cDNA	pRK5-SV40-Pur-MC
TU3A-FLAG	Expression von murinem TU3A mit C-terminalen FLAG	Amplifiziert mit TU3A-XhoI-F or und TU3A-FLAG-HindIII-Rev von muriner Cerebellum cDNA	pRK5-SV40-Pur-MC
HIS-TU3A-FLAG	Expression von murinem TU3A mit N-terminalen poly-Histidine und C-terminalen FLAG in Prokaryoten; induzierbar durch IPTG	Aus pRK5-TU3A-FLAG in pProEx-HtC mit EcoRI und HindIII	pProEx-Ht
GFP-TU3A	Expression von murinem TU3A mit N-terminalen EGFP	Aus pRK5-TU3A in pEGFP-C1 mit XhoI und HindIII	pEGFP-C1
GFP-TU3A-FLAG	Expression von murinem TU3A mit N-terminalen EGFP und C-terminalen FLAG	Aus pRK5-TU3A-FLAG in pEGFP-C1 mit XhoI und HindIII	pEGFP-C1
TO-TU3A	Induzierbares murines TU3A; Expression reprimierbar durch coexpression eines Transrepressors (pcDNA6-TR) der durch Tetrazyklin dereprimiert werden kann	Aus pEGFP-C1-TU3A in pcDNA4-TO mit XhoI und ApaI	pcDNA4-TO
TO-TU3A-FLAG	Induzierbares murines TU3A-FLAG	Aus pEGFP-C1-TU3A-FLAG in pcDNA4-TO mit XhoI und ApaI	pcDNA4-TO
pMAL-TU3A	Expression von murinem TU3A mit N-terminalen MBP in Prokaryoten; induzierbar durch IPTG	Aus pRK5-TU3A in pMAL-CR1 mit XhoI (blunt) aufgefüllt mit Herkulase) und HindIII	pMAL-CR1
pMAL-TU3A-FLAG	Expression von murinem TU3A mit N-terminalen MBP und C-terminalen FLAG in Prokaryoten; induzierbar durch IPTG	Aus pRK5-TU3A-FLAG in pMAL-CR1 mit XhoI (blunt) aufgefüllt mit Herkulase) und HindIII	pMAL-CR1

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur

Bakterien der Stämme *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 α und BL21(DE3)pLysS wurden in LB-Medium, welches mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin: 100 $\mu\text{g/ml}$ oder Kanamycin: 50 $\mu\text{g/ml}$) versetzt war, bei 37°C kultiviert. Für die Anzucht auf Nährböden sind die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen worden. Flüssigkulturen wurden von einer Einzelkolonie auf einer Agarplatte oder direkt aus der Glycerinkultur angeimpft und unter Schütteln bei 200 rpm kultiviert. Für die Langzeitlagerung der Bakterien ist eine Glycerinkultur erstellt worden. Hierzu wurde 1 ml der Übernachtskultur abzentrifugiert (3500 rpm, 4 min., 4°C), in 500 μl Glycerinmedium (LB-Medium + 50% Glycerin) resuspendiert und bei -80°C langfristig gelagert.

3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Damit *E.coli* Plasmid-DNA mittels der Hitzeschockmethode aufnehmen und replizieren konnte, mussten diese zuvor kompetent gemacht werden. Hierfür sind zunächst 10 ml des entsprechenden *E.coli* Stammes in LB-Medium über Nacht kultiviert worden. Die Kultur wurde in 150 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD von 0,6 kultiviert. Nach Abkühlen der Bakteriensuspension in Zentrifugenbechern für 5 min. auf Eis sind alle weiteren Schritte auf Eis und mit auf 4°C vorgekühlten Lösungen durchgeführt worden. Die Suspension wurde zentrifugiert (10 min., 4.500 rpm, 4°C in Beckman J2 Zentrifuge, Rotor JA-14), das Pellet in 45 ml TFB1-Puffer (30 mM Kaliumacetat pH 5,8, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 15% Glycerin, steril filtriert) resuspendiert und die Suspension 90 min. auf Eis inkubiert. Anschließend ist die Suspension erneut wie oben pelletiert und in 6 ml TFB2-Puffer (10 mM MOPS-KOH pH 6,8, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin, steril filtriert) resuspendiert worden. Die Bakterien wurden zu 200 μl aliquotiert und sofort in einem Trockeneis Ethanol Bad eingefroren. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80°C.

3.1.2 Transformation

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA durch *E.coli* mittels Hitzeschocktransformation wurden die kompetenten Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut. Zu 100 μl Bakteriensuspension wurde 10-50 ng Plasmid-DNA oder 10 μl Ligationsansatz gegeben und diese 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 sek., gefolgt von einer Inkubation auf Eis für 2 min. Die Bakteriensuspension wurde mit 900 μl SOC-Medium versetzt und 1 h

bei 37°C unter Schütteln bei 400 rpm inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden anschließend entweder auf Nährböden oder in Flüssigmedium kultiviert.

3.2 Klonierungen

Für die Überexpression der zu untersuchenden Proteine in Zelllinien wurde die entsprechende cDNA in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Die Plasmid-Konstrukte und die zur Erstellung angewandten Strategien sind in Kapitel 2.11 zusammengefasst. Für die Klonierungen sind unterschiedliche Strategien angewandt worden. Für die Klonierung von TU3A wurde revers transkribierte RNA mittels PCR mit Primern amplifiziert, die eine Restriktionsschnittstelle enthielten. Durch Restriktionsspaltung von Vektor und PCR-Produkt wurden überhängende Enden eingeführt, so dass die cDNA in den Vektor ligiert werden konnte. Weitere Konstrukte sind mittels ähnlicher Strategien erstellt worden, wobei anstelle revers transkribierter RNA ein Plasmid als Vorlage verwendet wurde, welches die cDNA des zu exprimierenden Proteins bereits enthielt. Als weitere Strategie, um eine klonierte cDNA in einen anderen Vektor einzufügen, wurde das Insert mittels Restriktionsspaltung aus einem Plasmid isoliert und in einen linearisierten Vektor mit gleichen Enden ligiert. Um eine Mutation in die cDNA einzufügen, kam folgende Strategie zum Einsatz: Es sind zunächst zwei PCR-Reaktionen von der zu mutierenden cDNA durchgeführt worden, wobei jeweils eine Hälfte der gesamten cDNA amplifiziert und die Mutation mittels der Primer in das PCR Produkt eingefügt wurde. Die Produkte der beiden PCR Reaktionen wurden mittels Agarose Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.4) und zusammen in einer weiteren PCR Reaktion verwendet. In dieser ist mit den 3'- und 5'- Primern für die Amplifikation der Vollängen-cDNA die cDNA, welche die Mutation trägt, amplifiziert worden. Die kodierende Sequenz der erstellten Konstrukte wurde abschließend durch Sequenzierung kontrolliert.

3.2.1 Präparation von RNA

Für das Arbeiten mit RNA wurden zuvor sämtliche zu verwendenden Geräte mit „RNase-Free“, einem Detergenz welches RNAsen inaktiviert, gereinigt, um einen Abbau der RNA zu vermeiden. Für die Isolation von RNA aus murinem Cerebellum Gewebe wurde das Trizol Reagenz nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierte RNA ist in RNase freiem dH₂O gelöst und anschließend spektrophotometrisch analysiert worden (siehe Kapitel 3.2.9).

3.2.2 Reverse Transkription

Zur Erstellung von cDNA aus isolierter RNA wurde eine reverse Transkription (RT) durchgeführt. Die Oligo-DT Primer für die RT binden an die 3'-Poly-A-Schwänze der

mRNA, so dass nur mRNA und keine andere RNA transkribiert wird. Pro Reaktionsansatz wurde 1 µg präparierte mRNA eingesetzt. Die RNA ist 5 min. bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis für 3 min. inkubiert worden. Die RT fand in einem Reaktionsvolumen von 20 µl statt (2 µl RT-Puffer, 200 µM dNTPs, 100 pmol Oligo-dT-Primer, 4 U Rnasin, 200 U RT (NEB), 1 µg hitzedenaturierte RNA, H₂O ad 20 µl). Für die RT wurde die Reaktionsmischung 1 h bei 37°C inkubiert. Die cDNA ist bis zur Verwendung in der PCR bei -20°C gelagert worden.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA Fragmente wurden mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Für die Amplifikation bei Klonierungen wurde eine thermostabile Pfu-Polymerase (Stratagene) verwendet, die eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und somit eine geringere Fehlerrate als die Taq-Polymerase aufweist. Die 3'- bzw. 5'-Oligonukleotide (=Primer) sind so konstruiert worden, dass sie die zu amplifizierende Sequenz flankieren und spezifisch an die DNA binden. Mit Hilfe der Oligonukleotide wurden zudem Veränderungen in die DNA-Sequenz eingefügt, wie z.B. Restriktionsschnittstellen, Mutationen oder Sequenzen, die für einen Protein-Tag kodieren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.10 zusammengefasst aufgeführt. Der Ansatz einer PCR Reaktion für Klonierungen umfasste in einem Volumen von 50 µl 1x Reaktionspuffer mit 20 mM MgSO₄, 10 pmol jedes Primers, 10-50 ng DNA und 1-2,5 U (Einheiten) Polymerase. Das PCR-Programm für die Amplifikation beinhaltete eine anfängliche Denaturierung für 5 min. bei 95°C, 24-35 Zyklen bestehend aus jeweils einem Denaturierungsschritt für 20 sek. bei 95°C, Annealing der Primer für 30 sek. bei 50-65°C (je nach Primer spezifischer Schmelztemperatur) und anschließende Elongation bei 72°C für 30-90 sek. Es folgte ein abschließender Extensionsschritt für 10 min. bei 72°C. Zur Kontrolle der PCR wurde 10 µl des Ansatzes in einem Agarosegel analysiert.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Als Kontrolle von PCR-Reaktionen und Restriktionsspaltungen sind die DNA Fragmente einer Reaktion in einem Agarosegel nach Größe aufgetrennt worden. Für die Erstellung eines Gels wurde 1-2% Agarose in 1x TBE Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C in eine Gel-Form gegossen. Die DNA-Proben sind vor dem Beladen mit 5x Ladepuffer (25% Glycerin, 2,5% SDS, 50 mM EDTA, 0,125% Bromphenolblau, 0,125% Xylencyanol) vermischt worden. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer (90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, 90 mM Tris-HCl pH 8,3), versetzt

mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, bei einer Spannung von 100-200 V für 30-60 min. Die DNA wurde auf einem UV-Transilluminator analysiert und digital dokumentiert.

3.2.5 DNA Ethanolfällung

DNA wurde mittels Ethanol-Fällung aufgereinigt bzw. konzentriert. Hierzu ist die DNA zunächst mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 3,5) versetzt und gemischt worden. Anschließend wurde das 2,5-fache Volumen Ethanol hinzugefügt, erneut gemischt und für 1 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt. Um DNA Lösungen mit einer geringen Konzentration zu fällen, sind diese mit 10-20 µg linearem Polyacrylamid als Carrier versetzt worden. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei (10 min., 13.000 rpm, 4°C) pelletiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in dH₂O oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA) zur weiteren Verwendung gelöst.

3.2.6 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von Plasmiden oder PCR-Fragmenten mit Restriktionsenzymen (=Restriktionsverdau) erfolgte nach Angaben der Hersteller im empfohlenen Puffer. Als Ausgangsmaterial für die Spaltung wurden 2-10 µg Plasmid oder ein gefälltes PCR-Produkt eingesetzt und mit 2-5 Einheiten Enzym in einem Reaktionsvolumen von 50-100 µl für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Spaltung wurde anschließend auf einem Agarose-Gel kontrolliert.

3.2.7 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA Fragmenten aus einem Agarosegel wurden die Banden aus dem Gel unter UV-Licht mit Hilfe eines sterilen Skalpells ausgeschnitten. Für die Extraktion der DNA aus dem Agarose Gel ist das QIAGEN-Gel Extraktions-Kit nach Herstellerangaben verwendet worden. Die Lagerung der aufgereinigten DNA erfolgte bei -20°C.

3.2.8 Ligation von DNA

Um ein DNA-Fragment (Insert) in einen Vektor einzufügen, wurde eine Ligation mittels T4-DNA-Ligase durchgeführt, die unter ATP Verbrauch eine 3'-OH- mit einer 5'-Phosphatgruppe der beiden DNA Enden kovalent unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verknüpft. Bei dieser Reaktion sollte das molare Verhältnis von Vektor und Insert 1:1 sein, wenn hierbei zwei überhängende Enden verknüpft werden müssen, und 1:2 bei Ligationen mit einem überhängenden und einem glatten Ende. Die Ligation wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 10 Einheiten T4-Ligase und 1x Ligationspuffer

(50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol) für 16 h bei 16°C durchgeführt.

3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarz-Küvette bestimmt. Die zu messende Lösung wurde so verdünnt, dass man sich im linearen Messbereich des Photometers zwischen 0,1 und 1,0 befand. Durch zusätzliche Messung bei 280 nm können mögliche Proteinkontaminationen detektiert werden. Der Quotient aus A₂₆₀ / A₂₈₀ sollte im optimalen Fall zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.3 Nukleinsäurepräparation und -reinigung

Für die Verwendung von Plasmid-DNA zur Transfektion von eukaryotischen Zellen in Kultur müssen die Plasmide in ausreichender Menge und Reinheit präpariert werden. Hierzu wurden die Plasmide in einer Bakterienkultur amplifiziert. Das Volumen der Kultur variierte je nach benötigter Plasmidmenge. Die Plasmid-DNA wurde in einem Volumen entsprechend der Größe der Präparation und je nach Verwendung in dH₂O oder TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) gelöst. Abschließend ist die Konzentration der Plasmid DNA photometrisch bestimmt und die Identität des Plasmids durch Restriktionsverdau überprüft worden.

3.3.1 Minipräparation von Plasmid DNA mittels Plasmid Minipräp Kit

Für die Präparation von Plasmid DNA im Mini-Format (Miniprep) wurde das „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit“ (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben verwendet. Als Ausgangsmaterial der Präparation dienten 10 ml einer Übernachtskultur von *E.coli*. Für eine anschließende Sequenzierung der Plasmide ist die Miniprep in 50 µl dH₂O eluiert und bei -20°C gelagert worden.

3.3.2 Megapräparation von Plasmid DNA mit Nucleobond AX Säulen

Für die Präparation von Plasmid DNA im Mega-Format (Megaprep), bei der Ausbeuten von ca. 2-5 mg Plasmid DNA zu erwarten sind, wurden Anionentauscher Säulen der Firma Macherey-Nagel (Nucleobond AX Kit) nach Herstellerangaben verwendet. Als Ausgangsmaterial der Präparation dienten 400 ml einer Übernachtskultur von *E.coli*. Die Plasmid-DNA wurde abschließend in 500-1000 µl TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) gelöst und bei -20°C gelagert.

3.3.3 Maxipräparation von Plasmid DNA mit Invitrogen PureLink HiPure Kit

Für die Transfektionen von primären Neuronen in Kultur wurden die Plasmide mit dem PureLink HiPure Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben aufgereinigt, da mit diesem Kit die Plasmid-DNA in hoher Reinheit und frei von Endotoxinen präpariert werden kann. Als Ausgangsmaterial der Präparation dienten 100 ml einer Übernachtskultur von *E.coli*. Die Plasmid-DNA wurde abschließend in 200 µl TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) gelöst und bei -20°C gelagert.

3.4 Zellkulturmethoden

3.4.1 Präparation von steroidfreiem FBS

Für die Präparation von steroidfreiem FBS wurden 500 ml FBS zunächst aufgetaut und durch Inkubation für 30 min. bei 56°C hitzeinaktiviert. Dieses FBS wurde anschließend mit 25 g des Anionenaustauscher Resin Materials AG1-X8 versetzt und 16 h unter kontinuierlichem Rühren bei 4°C inkubiert. Weiter wurde eine Aktivkohle-Dextran Mischung erstellt, indem 50 g Aktivkohle zunächst zweimal mit 500 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,8 gewaschen, bevor 5 g Dextran T70 in 400 ml Tris-HCl pH 8,0 hinzugegeben wurde. Die Aktivkohle-Dextran Mischung konnte autoklaviert und anschließend bei 4°C gelagert werden. Das FBS wurde durch Dekantieren von dem AG1-X8 Material getrennt, mit 10 ml Aktivkohle-Dextran Mischung versetzt und erneut für 16 h bei 4°C gerührt. Das steroidfreie FBS wurde von Feststoffen durch Zentrifugation (10 min., 1000 rpm, 4°C) und Filtration getrennt, anschließend steril filtriert und bei -20°C gelagert.

3.4.2 Propagation adhärenter Zellen

Die verwendeten, adhärent wachsenden Zelllinien sowie die primären Neuronenkulturen sind in sterilen Zellkulturflaschen oder Schalen in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und humidifizierter Atmosphäre kultiviert worden. Alle Arbeiten wurden an einer sterilen Arbeitsbank ausgeführt. Als Nährmedium für die Zelllinien diente DMEM, welches mit 10% FBS, 1% Antibiotika-Lösung und 1% Pyruvat versetzt worden ist. Um eine kontinuierliche Teilung der Zellen zu gewährleisten, wurden diese alle 2-3 Tage passagiert. Das Passagieren der Zellen variierte nach Zelltyp entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit. Hierzu wurde das Medium in der Zellkulturflasche abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA (verdünnt von 10x Trypsin Lösung mit 10x EBSS) pro 75 cm² Flasche gelöst (Inkubation 5-10 min. bei 37°C). Die Zellen wurden mit 3 ml Kulturmedium aufgenommen und die Suspension anschließend pelletiert (1000 rpm,

4 min., RT). Das Zellpellet ist in frischem Medium resuspendiert und entsprechend der Verdünnung in neue Flaschen verteilt worden.

3.4.3 Lagerung

Für die dauerhafte Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -190°C wurden Zellen einer konfluenten 75 cm^2 Flasche pelletiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert (DMEM, 50% FBS, 10% DMSO) und in ein Cryoröhrchen überführt. Um Gefrierschäden durch Kristallbildung zu minimieren, sind die Zellen zunächst bei -80°C eingefroren worden, bevor sie nach 1-2 Wochen in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, ist das Einfriermedium durch Zentrifugation und anschließender Resuspension in frischem Kulturmedium entfernt worden. Die Zellen eines Cryoröhrchens von einer 75 cm^2 Flasche wurden erneut in eine 75 cm^2 Flasche überführt und erst am darauf folgenden Tag passagiert.

3.4.4 Präparation primärer Neuronenkulturen

Für die Kultivierung von primären Neuronenkulturen wurden BL6 Mäuse verwendet. Die Präparation erfolgte nach einem Protokoll basierend auf Bayatti *et al.* (2003). Für Cerebellumkulturen wurde am ersten Tag nach der Geburt (P1) das Cerebellum, für Hippocampuskulturen am Embryonaltag 19 (E19) der Hippocampus in HBSS, 7 mM HEPES pH 7,4 bei 4°C präpariert und 20 min. mit 0,1% (m/v) Trypsin in PBS bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe in MEM (+20% HS) gewaschen und in MEM (+10% HS) durch pipettieren und Filtration durch eine Nylon Membran ($80\text{ }\mu\text{m}$) dissoziiert. Die Zellen sind falls nötig gezählt und in MEM mit 10% HS, 1% Pyruvat, 0,5% Gentamycin ausgesät worden. Nach 24 h wurde zu Neuro Basal A (NBA) Medium mit 2% B27, 0,5% Gentamycin und 0,5 mM Glutamin gewechselt.

3.4.5 Mycoplasmentest

Um die kultivierten Zellen auf eine eventuelle Kontamination mit Mycoplasmen zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Nachweismethoden angewandt. Durch Anfärben von Doppelstrang-DNA mit dem Bisbenzimid kann zytoplasmatische Mycoplasmen-DNA visualisiert werden. Hierzu sind die Zellen auf 10 cm Kulturplatten bis zu einer Dichte von 60-80% kultiviert worden. Für die Färbung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml Methanol fixiert und anschließend mit 5 ml einer Bisbenzimid Lösung ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) in Methanol für 15 min. bei 37°C gefärbt. Nachdem der Farbstoff abgesaugt und das Methanol verdunstet war, wurde die Fluoreszenz durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Mit

Mycoplasmen infizierte Kulturen erkennt man an einer meist gesprenkelten, im Cytoplasma verteilten Fluoreszenz, die sich von der zellulären Kernfluoreszenz klar abgrenzt.

Daneben sind Zellkulturen durch PCR-Reaktionen getestet worden, indem die Mycoplasmen spezifischen Gene für 16S-rRNA amplifiziert wurden. Hierzu wurde ein 1 ml Mediumüberstand einer Zellkultur für die PCR mit dem EZ-PCR Mycoplasma Test-Kit nach Hersteller Angaben verwendet.

3.4.6 Transfektionen

Für die Überexpression verschiedener Proteine in eukaryotischen Zellen wurden die entsprechenden Expression-Plasmide mittels verschiedener Transfektionsmethoden in die Zellen gebracht.

3.4.6.1 Elektroporation von Zelllinien

Bei der Transfektion mittels Elektroporation wird durch einen elektrischen Impuls die Durchlässigkeit der Zellmembran erhöht, so dass Partikel wie DNA von der Zelle aufgenommen werden können. Die Elektroporation wurde in Elektroporationsküvetten und einem Elektroporationsgerät der Firma Biorad (Gene Pulser II) durchgeführt. Für eine Elektroporation wurden ca. 60 cm² konfluente Zellen verwendet. Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben gelöst und in PBS durch Resuspendieren und erneute Zentrifugation gewaschen. Die Zellen sind in 400 µl sterilem Elektroporationspuffer (50 mM K₂HPO₄, 20 mM K-Acetat, pH 7,35 mit Essigsäure eingestellt und mit 1:40 Volumen einer 1 M MgSO₄-Lösung, pH 6,7 komplettiert) resuspendiert und in die Elektroporations-küvetten verteilt worden. Es wurde bis zu 15 µg Plasmid DNA transfiziert, die direkt zu der Zellsuspension in der Elektroporationsküvette gegeben worden ist. Die Suspension wurde in der Küvette durch leichtes Antippen vermischt und in das Elektroporationsgerät überführt. Für den Impuls sind folgende zelltypspezifische Parameter verwendet worden: SK-N-MC: 300 kV, 600 µF; HeLa, HEK-293 und NIH-3T3: 350 kV, 700 µF; Neuro2a: 300 kV, 500 µF. Nach der Elektroporation wurde die Suspension in 1-2 Zellkulturschalen und einer Gesamtwachstumsfläche von ca. 60 cm² überführt und 12-72 h (i.d.R. 72 h) kultiviert.

3.4.6.2 Elektroporation von primären Neuronen

Die Transfektion von primären Neuronen aus dem Hippocampus (HIP) wurde in einem Elektroporationsgerät der Firma Amaxa (Nucleofector II) mit dem Basic Neuron SCN Nucleofector Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. 2x10⁶ frisch präparierte HIP Zellen sind in 100 µl Puffer des Kits resuspendiert worden zu dem 2 µg pDNA (aufgereinigt mit

PureLink HiPure Kit) gegeben wurde. Nach der Elektroporation mit dem Programm O-003 wurden die Zellen in MEM (10% HS, 1% Pyruvat, 0,5% Gentamycin) resuspendiert und auf Lysin beschichtete Deckgläser in 12 well Platten (4 cm²) ausgesät.

3.4.6.3 Transfektion kationischem Polymer

Bei der Transfektion mittels kationischen Polymers bildet die negativ geladene DNA mit einem Polyethylenimin-Derivat (ExGen 500, Fermentas) durch ionische Wechselwirkungen Partikel, die von der Zelle durch Endocytose aufgenommen werden können. Plasmidmengen und Reaktionsvolumina wurden je nach Zellkulturfläche entsprechend der Herstellervorgaben angepasst. Die Menge des verwendeten ExGen ist proportional zu der Menge an Plasmid DNA. Für die Transfektionen wurden i.d.R. 6 Äquivalente an ExGen verwendet, wobei ein Äquivalent die theoretische Menge an ExGen bezeichnet die notwendig ist, um die negativen Ladungen der Phosphatgruppen in Plasmid DNA zu neutralisieren. Da 1 µg DNA 3 nmol Phosphat enthält und 1 µl ExGen 500 (10 µM) 5,47 mM Stickstoffresten entspricht, berechnet sich die Menge an ExGen bei 6 Äquivalenten wie folgt:

$$\text{ExGen } [\mu\text{l}] = \text{gesamt DNA } [\mu\text{g}] \times 3 \times 6 (\text{Äquivalente}) / 5,47.$$

Für die Transfektion mit ExGen wurden die Plasmide in steriler, isotonischer Kochsalzlösung (150 mM NaCl) verdünnt, mit ExGen versetzt, „gevortext“ und 15 min. bei RT inkubiert. Die Plasmidmischung wurde anschließend mit Zellkulturmedium auf das zehnfache Volumen gebracht und auf die Zellen gegeben. Um das Absetzen der Partikel zu fördern, wurden die Zellkulturen zentrifugiert (280 g, 5 min., RT) und anschließend, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, inkubiert. Das Medium ist nach 6-24 h gewechselt worden.

3.4.7 Reportergenassays

Zur Untersuchung der Aktivität verschiedener SR sind Reportergenassays durchgeführt worden. In einem Reportergenassay wird durch die Messung der Aktivität eines spezifischen Enzyms (hier der Reporter) auf die transkriptionelle Aktivität eines Promotors, welcher die Expression des Reportergens reguliert, geschlossen. In der vorliegenden Arbeit wurden Reportergenkonstrukte verwendet, welche die Expression des Fireflyluciferasegens durch den Promoter des mouse mammary tumor virus (MMTV-Luc) oder durch einen Promoter mit zwei Estrogen Response Elementen (ERE-Luc), reguliert. Da die untersuchten SR als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren an den MMTV-Promoter binden und die Expression des Reportergens bewirken, konnte die transaktivierende Aktivität der Rezeptoren durch Messung der Reporteraktivität bestimmt werden. Die Fireflyluciferase katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Emission von Licht, welches

in einem Luminometer detektiert wurde. Unter Substratsättigung ist die Enzymaktivität proportional zur gebildeten Enzymmenge und somit zur Aktivität des Transkriptionsfaktors. Zur Normalisierung der gemessenen Reporterogenaktivität wurde die Aktivität einer Gaussia-luciferase gemessen, die durch den konstitutiv aktiven CMV Promoter exprimiert wird. Die Gaussia-luciferase ist, ausgehend von einer käuflich erworbenen sezernierten Form, durch Anhängen der C-terminalen Aminosäuresequenz KDEL, die ein Retentionssignal für das endoplasmatische Reticulum darstellt, so modifiziert worden, dass diese nicht sezerniert wurde. Somit konnte die Aktivität der Gaussia-KDEL in demselben Extrakt gemessen werden, in dem zuvor die Fireflyaktivität gemessen wurde.

Die Reportergenassays wurden in 96-Loch Zellkulturplatten mit SK-N-MC Zellen durchgeführt. Es sind 30.000 Zellen pro Reaktion ($100.000 \text{ Zellen/cm}^2$) in $200 \mu\text{l}$ DMEM (+10% Steroid freies FBS) ausgesät und 24 h kultiviert worden. Die Transfektion der Plasmide erfolgte mittels ExGen wie in Kapitel 3.4.6.3 beschrieben. Für eine Reaktion wurden 60 ng MMTV-Luc oder ERE-Luc (Reportergenplasmid), 25 ng SR-Expressionsplasmid, bis zu 300 ng Cofaktorexpressionsplasmid und 5 ng Gaussia-KDEL (Normalisierungsplasmid) in einem Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$ transfiziert. Nach 24 h Kultivierung ist die Expression des Reporters stimuliert worden, indem zu Medium gewechselt wurde, welches mit Hormon bzw. Ethanol als Kontrolle versetzt war. Die Zellen sind für 24 h kultiviert worden, bevor sie für die Messung der Reportergenaktivität lysiert wurden. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in $50 \mu\text{l}$ passivem Lysis Puffer ($0,2\%$ Triton X-100; 100 mM KPO_4 pH 7,8) durch Schütteln (200 rpm , 15 min. , RT) lysiert. Die Messung der Luziferaseaktivitäten erfolgte in einem Luminometer mit Injektionsvorrichtung, so dass die Aktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt nach dem Starten der Reaktion gemessen werden konnte, um die spezifische Kinetik der einzelnen Luciferasen zu berücksichtigen und eine möglichst sensitive Messung zu gewährleisten. Für die Messung sind zunächst $10 \mu\text{l}$ des Lysats in eine schwarze 96-Lochplatte überführt worden. Zum Starten der Fireflyluziferasereaktion wurde $50 \mu\text{l}$ Fireflysubstratlösung (Endkonzentration in der Reaktionslösung: $16,7 \text{ mM}$ KPO_4 pH 7,8, $2,5 \text{ mM}$ MgCl_2 , 2 mM ATP; $100 \mu\text{M}$ Luciferin) durch die Injektionsvorrichtung des Luminometers injiziert. Die Lumineszenz ist nach schütteln (1 sek.) über 10 sek. gemessen und integriert worden. Um mögliche Überstrahleffekte zwischen den Löchern der Platte zu reduzieren, ist zunächst die Fireflyaktivität aller Reaktionen einer Platte gemessen worden, bevor die Gaussia-luciferaseaktivität gemessen wurde. Hierzu ist $50 \mu\text{l}$ Gaussiasubstratlösung ($1,1 \text{ M}$ NaCl, $2,2 \text{ Na}_2\text{EDTA}$, $0,22 \text{ M}$ K_xPO_4 , pH 5,1, $0,44 \text{ mg/ml}$ BSA, Coelenterazine $3 \mu\text{g/ml}$) injiziert

und die Lumineszenz nach schütteln (1 sek.) und 3 sek. Pause über 5 sek. gemessen und integriert worden. Für die Auswertung der Daten wurde von jedem Luciferasemesswert zunächst der Gerätehintergrund subtrahiert, bevor zur Normalisierung der Quotient aus Firefly/Gaussia berechnet wurde. Die Stimulierbarkeit eines Rezeptors durch Hormongabe wurde durch Normierung auf den unstimulierten (Ethanol) Kontrollwert dargestellt. In jedem Experiment waren die Bedingungen in Duplikaten oder Triplikaten repräsentiert.

Zur Kontrolle der Expression des Rezeptors und der Cofaktoren sind die Lysate durch SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.5.3) und Immunoblotting (siehe Kapitel 3.5.5) analysiert worden. Für die Probenaufbereitung wurden die restlichen Lysate der Duplikate oder Triplikate einer Bedingung vereinigt und die Lösung in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac, Eppendorf) eingedampft. Das Pellet ist in 30 µl 1x Laemmli-Lysispuffer (40 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 5% Glycerol, 0,005% Bromphenolblau, 1,4 M 2-Mercaptoethanol) gelöst und 5 min. bei 95°C aufgekocht worden, bevor es in einem 10-12% SDS-Gel aufgetrennt wurde.

Alternativ sind für die Expressionkontrollen 500.000 SK-N-MC Zellen in einer 6 well platte (>50.000 Zellen / cm²) in 2 ml steroidfreiem DMEM ausgesät und 24 h kultiviert worden, bevor mittels ExGen, wie in Kapitel 3.4.6.3 beschrieben, 0,25 µg Steroidhormonrezeptor Expressionsplasmide und 2 µg Cofaktor Expressionsplasmide transfiziert wurden. 24 h nach der Transfektion sind die Zellen 24 h in steroidfreiem DMEM kultiviert worden, das mit subsaturierenden Konzentrationen von dem Hormon versetzt wurde, welches zur Stimulation des jeweiligen transfizierten Rezeptors verwendet worden ist. Für die Analyse der Expression mittels SDS-PAGE und Immunoblotting (siehe Kapitel 3.5.3 und 3.5.5) wurden die Zellen zunächst mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend in 150 µl Protein Lysis Puffer, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben lysiert.

3.4.8 Coimmunpräzipitation

Die Coimmunpräzipitation (CoIP) ist eine Methode, um physikalische Wechselwirkungen zwischen Proteinen nachzuweisen. Hierbei können sowohl Proteine nachgewiesen werden, die direkt (über intermolekulare Bindungen) interagieren, also auch gemeinsam in einem Heterokomplex befindliche Proteine. Durch Immobilisierung eines Proteins an eine Agarose- oder Sepharose-Matrix über spezifische, an die Matrix gekoppelte Antikörper, werden die interagierenden oder im Komplex befindlichen Proteine copräzipitiert. Diese können gemeinsam mit dem präzipitierten Protein eluiert und proteinbiochemisch (z.B. durch SDS-PAGE) analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden FLAG- sowie HA-gekoppelte Proteine mit FLAG- (anti-FLAG) bzw. HA-Antikörpern (anti-HA) gekoppelter Agarose präzipitiert. Zellen, die

mittels Elektroporation (siehe Kapitel 3.4.6.1) transfiziert wurden und ein Protein mit dem entsprechenden Tag exprimierten, sind durch Abschaben mit einem Zellschaber in 1 ml PBS geerntet und pelletiert (1.000 g, 5 min., 4°C) worden. Das Pellet ist in 1 ml Lysis Puffer A' (LPA': 130 mM NaCl, 20 mM Na₂MoO₄, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% Glycerin, 0,5% TritonX-100, komplettiert mit 10 µl Proteaseinhibitor-Cocktail pro 1 ml LPA') und kurzer Sonifizierung (Branson Cell Disruptor B15, 3x 5 sek., Stärke 3) lysiert worden. Das Lysat wurde 1 h auf Eis inkubiert, anschließend von unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min., 4°C) getrennt und die Proteinkonzentration des Überstandes mittels des BCA-Kits (siehe Kapitel 3.5.2.2) bestimmt. Die Agarosematrix ist nach Herstellerangaben vorbereitet und abschließend mit LPA' gewaschen worden. Für die Präzipitation aus 1-2 mg Zelllysat in 1 ml Reaktionsvolumen wurden 30 µl Agarose-Matrix (1:1 Suspension in Puffer) verwendet. Um rekombinantes TU3A zu präzipitieren, ist 25 µg MBP-TU3A-FLAG zum Lysat von untransfizierten Zellen gegeben worden. Die Präzipitation erfolgte durch Inkubation auf einem Überkopftrotierer bei 4°C für 1-16 h. Anschließend ist die Matrix dreimal mit kaltem LPA' ohne TritonX-100 gewaschen worden, indem sie zentrifugiert (10.000 g; 30 sek., 4°C), und der Überstand abgenommen wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Präzipitat durch Inkubation mit 50 µl FLAG-Peptid 100 µg/ml in TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,0) 30 min. bei 4°C auf einem Überkopftrotierer eluiert. Um die relative Bindung verschiedener Proteine des SR-Heterokomplexes mit den präzipitierten FLAG-gekoppelten TPR-Cofaktoren zu ermitteln, ist das Eluat der FLAG-CoIP in zwei Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden. Das eine Gel wurde anschließend per Immunoblot auf die Bindung der HA-gekoppelten SR und p23 hin untersucht. In dem zweiten Gel wurden mittels Coomassiefärbung die aufgetrennten Proteine visualisiert, um die Bindung von Hsp70 und Hsp90 zu ermitteln sowie die Menge an präzipitiertem TPR-Cofaktor. Für die Ermittlung der relativen Bindung von den copräzipitierten Proteinen sind die Immunoblots und coomassiegefärbten Proteinbanden zunächst densitometrisch analysiert worden (siehe Kapitel 3.5.6).

Um die relative Bindung der SR an die mittels FLAG-IP präzipitierten TPR-Proteine zu bestimmen, wurde das Rezeptor-IB Signal auf das FLAG-Coomassie Signal aus dem Eluat normalisiert. Damit die relative Bindung aus mehreren Experimenten gemittelt werden konnte, mussten die Ergebnisse aus jedem Einzelexperiment normiert werden. Die Abweichung der Bindung der SR an ein TPR-Protein ist von der mittleren Bindung aller Konditionen in einem Experiment dargestellt worden. Hierzu wurde der Mittelwert der normalisierten Bindungen berechnet und der Quotient der Bindung der Rezeptoren an jedes

TPR-Protein mit diesem Mittelwert bestimmt. Um die relative Bindung der TPR-Proteine an die mittels HA-IP präzipitierten Rezeptoren zu bestimmen, wurde in jedem Experiment das FLAG-Eluatsignal der copräzipitierten TPR-Proteine auf das HA-Eluatsignal der präzipitierten Rezeptoren und anschließend mit dem FLAG-IB Signal aus dem Lysat, welches die relative Expression der TPR-Proteine darstellt, normalisiert. Damit die relative Bindung aus mehreren Experimenten gemittelt werden konnte, mussten die Ergebnisse aus jedem Einzelexperiment ähnlich der FLAG-IP normiert werden. Da auf Grund der Variabilitäten in der HA-IP jedoch nicht bei jedem Experiment ein Signal für jedes TPR-Protein detektiert wurde, konnte die relative Bindung nicht auf die mittlere Bindung aller TPR-Proteine in einem Experiment normiert werden. Stattdessen ist für jeden Rezeptor eine Auswahl von TPR-Proteinen verwendet worden, die für die Normierung der Bindungen gemittelt wurden. Die Auswahl der TPR-Proteine, die für die Normierung der HA-IP des jeweiligen Rezeptors verwendet worden sind, ist in der Legende des entsprechenden Experiments angegeben.

3.4.9 MTT-Zellviabilitätstest

Zur Ermittlung der Zellviabilität wurden MTT-Assays durchgeführt. Bei diesem Assay wird die Aktivität von zellulären Reduktasen gemessen, die den gelben MTT Farbstoff zum violetten Formazan reduzieren, was als Maß der metabolischen Aktivität und somit der Viabilität der Zellen verwendet wird.

Zellen sind in 96-Lochplatten ausgesät und ggf. mit ExGen transfiziert worden (siehe Kapitel 3.4.6.3). Nach Inkubation der Zellen wurden 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml MTT in PBS) pro Loch hinzugegeben und 3-8 h bei 37°C inkubiert bis sich violette Kristalle gebildet haben. Anschließend wurden in jedes Loch 10 µl Solubilisierungspuffer (5% SDS, 50% Dimethylformamid, pH 4,1 mit Essigsäure eingestellt) gegeben und die Platten ÜN bei 4°C inkubiert. Die Umsetzung von MTT zu Formazan wurde durch Messung der Absorption bei 630 nm mit einem Spektrophotometer ermittelt.

3.4.10 Immunfluoreszenzfärbung

Die Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle kann durch die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Man unterscheidet hier die Analyse von Proteinen, die mit einem fluoreszierenden Protein (z.B. GFP: „greenfluorescence-protein“) fusioniert sind und in der Zelle überexprimiert werden, von dem immunologischen Nachweis durch Antikörper, die mit einem Fluorophor gekoppelt sind. Hierzu sind die zu untersuchenden Zellen auf beschichteten Deckgläsern in einer Zellkulturplatte kultiviert worden. Für die Beschichtung wurden die Deckgläser entweder mit 0,1% Gelatine, Poly-

Ornithine (0,1 mg/ml) oder mit Poly-D-Lysine (0,1 mg/ml) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. 24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen ggf. mittels ExGen (siehe Kapitel 3.4.6.3) transfiziert. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 4% PFA für 20 Minuten und anschließendem Waschen mit PBS. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen durch Inkubation mit 0,2% TritonX-100 für 20 min. permeabilisiert. Blockiert wurde durch Inkubation mit 10% Goat-Serum oder 2% BSA in PBS für 1 h bei RT. Die Inkubation des ersten Antiköpers erfolgte durch Verdünnung des Antiköpers in Abdil-Lösung (2% BSA, 0,1% TritonX-100 in PBS) ÜN bei 4°C. Nach Waschen mit PBS wurde der zweite Antikörper in Abdil-Lösung für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Färbung mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin (100 nM in Abdil) erfolgte für 20 min. bei RT. Eine DAPI Färbung erfolgte durch Inkubation mit diesem Farbstoff (5 µg/ml in PBS) für 10 min. bei RT. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen unter Zugabe eines Tropfens Einbettmedium mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger gelegt. Für eine Langzeitlagerung sind die Objektträger mit klarem Nagellack versiegelt und bei -20°C gelagert worden. Die Fluoreszenzlokalisierung wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop oder einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) untersucht.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Erstellung von Proteinlysaten aus Zellen in Kultur

Für die Erstellung von Proteinlysaten zur Analyse der Expression von verschiedenen Proteinen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um Bestandteile des Zellkulturmediums zu entfernen. Anschließend sind die Zellen durch Zugabe von Protein Lysis Puffer (20 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,67% SDS, 3,3% Saccharose; vor der Verwendung komplettiert mit Protease Inhibitor Cocktail) und Abschaben in ein Reaktionsgefäß überführt worden. Das Lysat wurde kurz sonifiziert (zweimal 3 sek., Stärke 2-3) und 5 min. bei 95°C inkubiert, um verbleibende Protasen zu denaturieren. Das Lysat ist durch Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min., 4°C) von unlöslichen Bestandteilen getrennt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert worden.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinkonzentration in Lösungen durch verschiedene Methoden ermittelt.

3.5.2.1 Absorptionsmessung

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration in homogenen Proteinlösungen wurde die Absorption der zu messenden Lösung bei 280 nm ermittelt. Da die Methode auf der Extinktion von Tryptophan und Tyrosin bei 280 nm basiert, besitzt jedes Protein einen spezifischen Extinktionskoeffizienten, basierend auf der Abundanz dieser Aminosäuren, der für die Berechnung der Proteinkonzentration benötigt wurde. Für die Messung in einer Quarzküvette sind die Proteine falls nötig zunächst in Guanidin HCl (Endkonzentration 6 M) verdünnt worden.

3.5.2.2 BCA-Kit Bestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von komplexen Proteingemischen wie Lysaten wurde i.d.R. das BCA-Kit (Pierce) nach Herstellerangaben verwendet. Diese Methode basiert auf der Kombination der Biuret-Reaktion, bei der in Abhängigkeit der Proteinkonzentration Cu^{2+} gebildet wird, mit einem colorimetrischen Cu^{2+} -Nachweis durch die Bicinchoninsäure (BCA). Das violette Reaktionsprodukt, mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm, erlaubt die photometrische Quantifizierung und Ermittlung der Proteinkonzentration durch Vergleich der Absorption mit einer Eichkurve.

3.5.2.3 2D-Quant Kit Bestimmung

Bei Proben, die in einem Puffer mit großen Mengen an Harnstoff und Thioharnstoff gelöst waren, wurde die Proteinkonzentration mit dem 2D-Quant Kit (Amersham) nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode beruht auf der quantitativen Präzipitierung der Proteine. Das Präzipitat wird in einer Lösung resuspendiert, die Cu^{2+} -Ionen enthält, welche an die Proteine binden. Die Menge an gebundenen Cu^{2+} wird indirekt durch Zugabe eines colorimetrischen Reagenz gemessen, das die Menge des verbliebenden Cu^{2+} in Lösung detektiert. Somit ist die Proteinkonzentration umgekehrt proportional zur gemessenen Absorption.

3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode, um Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel durch Anlegen eines

elektrischen Feldes aufzutrennen. Die Auftrennung erfolgt in Anwesenheit des denaturierenden, amphipatischen Detergenz SDS, welches sich an die Proteine lagert und diesen eine stark negative Ladung verleiht, wodurch die Auftrennung im elektrischen Feld nur durch die Masse des Proteins und die angelagerten SDS-Moleküle bestimmt wird, d.h. die Ladungen der Aminosäuren vernachlässigbar sind. Die Polyacrylamid-Gele unterteilen sich in ein oberes Sammelgel und ein darunter liegendes Trenngel. Die Proteine werden beim Übergang der beiden Gele zu einer scharfen Lauffront konzentriert und anschließend im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die Gele sind in einer speziellen Aparatur (Biorad) zwischen zwei Glasplatten gegossen worden, die durch 1 mm breite „Spacer“ getrennt waren. Es wurde zuerst das Trenngel (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 10-15% Acrylamid) gegossen, das mit Isopropanol überschichtet wurde, um eine gerade Trenngelkante zu gewährleisten. Das Sammelgel mit den Probestaschen ist über das Trenngel gegossen worden, nachdem dieses vollständig polymerisiert war. Hierzu wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 4% Acrylamid; Polymerisation induziert durch Zugabe von 0,1% APS und 0,001% Temed) zwischen die Glasplatten über das Trenngel gegossen und anschließend ein Kamm eingeführt, der die Probestaschen formt. Für die Auftrennung im Gel sind die Proben mit Auftragspuffer versetzt (Endkonzentration: 40 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 5% Glyzerin, 0,005% Bromphenolblau; 1,4 M 2-Mercaptoethanol) und 5 min. bei 95°C denaturiert worden. Das im Auftragspuffer enthaltene 2-Mercaptoethanol verhindert hierbei die Ausbildung von Disulfidbrücken. Die Elektrophorese wurde in einer mit Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,5% SDS, pH wird nicht eingestellt) befüllten Kammer (Biorad) bei 80-180 V konstanter Spannung durchgeführt. Die im Gel aufgetrennten Proteine sind anschließend mit Coomassie gefärbt oder für das Immunoblotting auf eine Nitrocellulosemembran transferiert worden.

3.5.4 Coomassiefärbungen

Um die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine zu visualisieren, sind diese mit Coomassie gefärbt worden. Je nach Verwendung wurde die Färbung mit verschiedenen Methoden durchgeführt.

Für die größtmögliche Sensitivität sind die Proteine mit kolloidalem Coomassie gefärbt worden. Hierzu wurde das Gel UN in Fixierlösung (50% Ethanol, 2% Phosphorsäure) fixiert, dreimal mit dH₂O gewaschen und anschließend 1 h in Färbelösung (17% Ammoniumsulfat, 2% Phosphorsäure, 34% Methanol) inkubiert. Für die Färbung ist 1 mg/ml Collodial Coomassie Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich) auf die Färbelösung gegeben

und das Gel in dieser Suspension bis zu 3 Tage inkubiert worden. Für eine schnellere Färbung wurde das Gel für 10-15 min. in Färbelösung (0,1% Coomassie-Brillant Blau R, 45% Methanol, 10% Essigsäure) gelegt. Um den Kontrast der Färbung zu erhöhen, ist das Gel anschließend in Entfärbelösung (45% Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert worden, die mehrfach erneuert wurde, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abgehoben haben. Die mit Coomassie gefärbten Gele sind anschließend in dH₂O gewaschen worden bevor sie digital dokumentiert werden konnten (siehe Kapitel 3.5.6). Um ein mit Coomassie gefärbtes Gel anschließend auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren, wurde es zunächst 30 min. in SDS Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,5% SDS) inkubiert und anschließend dreimal in dH₂O gewaschen, gefolgt von 10 min. Äquilibrierung in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% Methanol, 0,04% SDS).

3.5.5 Immunoblotting

Für eine immunologische Charakterisierung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine sind Immunoblotanalysen (auch Westernblot) durchgeführt worden. Hierzu wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Auf dieser können die Proteine mit spezifischen Antikörpern erkannt und mit Antikörpern, die eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt haben, durch Chemilumineszenz detektiert werden.

Der Transfer wurde in einer speziellen Aparatur (Biorad) in Transferpuffer durchgeführt. Hierzu wurden die Polyacrylamidgele zunächst in Transferpuffer äquilibriert (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% Methanol). Das Gel ist auf einer Nitrocellulosemembran zwischen je zwei Whatmanpapieren und abschließend je einem Schwamm platziert und in die Apparatur eingespannt worden. Der Transfer erfolgte mit 100 V für 60-90 min. bei 4°C. Um den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran zu kontrollieren, wurde diese nach dem Blotten reversibel mit Ponceau Lösung gefärbt und mit H₂O wieder entfärbt. Für die Immundetektion der Proteine auf der Membran mittels spezifischer Antikörper sind auf der Membran zunächst unspezifische Bindungstellen durch Inkubation mit Block-Puffer (5% Milchpulver in TBS-T: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,0, 0,1% Tween-20) für 30 min. maskiert worden. Die Antikörper für die Proteindetektion wurden in TBS-T verdünnt (1:1000 – 1:500.000) und die Inkubation erfolgte von 1 h bei RT bis ÜN bei 4°C. Zwischen den Antikörperinkubationen und vor der Chemilumineszenzdetektion wurde die Membran mindestens dreimal mit TBS-T gewaschen. Für die Chemilumineszenz ist die Membran in Luminolreagenz (Milipore) inkubiert und die Lichtemission durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert worden.

3.5.6 Densitometrie

Um die Intensität von Proteinbanden eines mit Coomassie gefärbten Gels oder die Signale eines Westernblots auf einem Röntgenfilm zu ermitteln, wurden diese zunächst mit einem kalibrierten Densitometerscanner (GS-800, Biorad) digitalisiert. Die erzeugten 16 bit (65.536 Graustufen) Bilddateien im verlustfreien TIF Format wurden mit der „Kodak 1D Image Analysis“ Software für die Ermittlung der Bandenintensitäten weiterverarbeitet. Für die Analyse der Ergebnisse sind die „Net-Intensitäten“ verwendet worden, welche die Summe der Grauwerte abzüglich des Hintergrundwerts in einem definierten Bandenbereich angibt.

3.5.7 Proteinexpression und -aufreinigung

Für die Erstellung polyklonaler Antikörper und für *in vitro* Experimente wurde TU3A rekombinant in Bakterienzellen exprimiert und aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte über Affinitätschromatographie, indem verschiedene Tag-Sequenzen an das TU3A Protein fusioniert wurden. Das mit einem Polyhistidintag gekoppelte TU3A-FLAG (HIS-TU3A-FLAG) ist in BL21(DE3)pLysS Bakterien (Invitrogen) durch Induktion mit 1 mM IPTG für 3 h bei 37°C exprimiert worden. Die Bakterien wurden unter denaturierenden Bedingungen in Harnstoff-Puffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M Urea pH 8,0; komplettiert mit Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA) lysiert. Die Aufreinigung erfolgte in HisTrap HP Säulen (GE Healthcare). Für die Bindung ist das Lysat vor dem Laden auf die Säule im Verhältnis von 1:1 mit nativem Lysis Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole) vermischt worden. Die Säule wurde mit nativem Lysis Puffer mit 50 mM Imidazole gewaschen und das Protein mit 500 mM Imidazole in nativem Lysis Puffer eluiert. Das Eluat ist anschließend mit Vivaspin Filtersäulen (Sartorius, Porengröße für >5 kDa) konzentriert und mit PD10 Sephadex Säulen (GE Healthcare) zu Immunisierungspuffer (1 M Urea, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 300 mM NaCl, 0,1% SDS, 10% Glycerol; steril filtriert) umgepuffert worden.

Da das HIS-TU3A-FLAG nicht stabil unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden konnte, wurde für die *in vitro* Experimente TU3A aufgereinigt, welches an das maltosebindende Protein (MBP) gekoppelt war. Dieses 43 kDa große MBP-Tag erhöht zum einen die Löslichkeit und Stabilität des zu untersuchenden Proteins und kann zum anderen als Affinitätstag für die Aufreinigung mittels einer Amylose-Agarose Matrix verwendet werden. MBP- und FLAG-gekoppeltes TU3A (MBP-TU3A-FLAG) wurde in BL21(DE3)pLysS Bakterien durch Induktion mit 0,2 mM IPTG für 2 h exprimiert und mittels einer Amylose-

Agarose Matrix (NEB) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Noch im Eluat enthaltene Verunreinigungen sind durch eine weitere Aufreinigung mit einer FLAG-Agarose Matrix (Sigma) entfernt worden. Hierbei wurde das MBP-TU3A-FLAG mit dem FLAG-Peptid (100 mg/ml in 5 mM Tris-HCl pH 8,0) eluiert und das Eluat anschließend mit Centricon Filtersäulen (Millipore YM-50, Porengröße für >50kDa) konzentriert. Die Proteinkonzentration ist durch Absorptionsmessung (siehe Kapitel 3.5.2.1) und SDS-PAGE gefolgt von Coomassiefärbung bestimmt worden, indem die Bandenintensität mit einem Referenzprotein (FLAG-BAP, Sigma) verglichen wurde. Durch die Gelfärbung konnte zudem die Proteinreinheit bestimmt werden. Die *in vitro* Experimente sind mit dem MBP-TU3A-FLAG Fusionsprotein durchgeführt worden, da TU3A-FLAG auch bei 4°C in dem verwendeten Puffer instabil war, nachdem das MBP-Tag mittels FaktorXa-Protease abgespaltet wurde (Daten nicht gezeigt).

3.5.8 Aktinzentrifugationsassay

Der Aktinzentrifugationsassay ist eine Methode um Aktin bindende Proteine und deren potentiellen Einfluss auf das Aktinpolymerisationsgleichgewicht zu identifizieren. Bei dieser Methode wird aufgereinigtes globuläres G-Aktin *in vitro* zu filamentösem F-Aktin polymerisiert, welches durch Zentrifugation bei 150.000 g pelletiert werden kann. Um die direkte Bindung von MBP-TU3A-FLAG an F-Aktin zu untersuchen, wurde zunächst 16 µM globuläres nicht β-Aktin aus humanen Blutplättchen (Cytoskeleton) in GAB-Puffer (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 0.5 mM DTT) durch Zugabe von 1/10 Volumen 10x FAB-Puffer (500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM ATP) und Inkubation für 1 h bei 25°C (in einem Thermocycler, Peqlab) zu F-Aktin polymerisiert. Anschließend wurden 10 µl MBP-TU3A-FLAG (0,5 µg/ml) zu 40 µl F-Aktin gegeben und 30 min. bei 25°C inkubiert. Aktin Filamente sind von nicht polymerisiertem G-Aktin durch Zentrifugation (1,5 h, 34.000 rpm in Beckman SW-60 Ti Rotor, 25°C) getrennt worden. Die G-Aktin-Fraktion im Überstand (45 µl von 50 µl Zentrifugationsvolumen) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µl 5x Auftragspuffer (200 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% SDS, 25% Glycerin, 0,025% Bromphenolblau; 7 M 2-Mercaptoethanol) versetzt. Die F-Aktin Fraktion im Pellet ist in 50 µl 1x Auftragspuffer resuspendiert worden. Beide Fraktionen wurden für die Analyse mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt.

Um einen Einfluss von TU3A auf das dynamische Aktinpolymerisationsgleichgewicht zu untersuchen, wurde der Aktinzentrifugationsassay so modifiziert, dass das Gleichgewicht nicht eindeutig auf einer Seite lag. Hierdurch sollten Verschiebungen in die

eine oder andere Richtung detektiert werden können. Zudem wurde die Polymerisation in Anwesenheit von TU3A durchgeführt. Hierfür wurde G-Aktin in 35 μ l GAB-Puffer verdünnt und das Testprotein in 10 μ l 5 mM Tris-HCl pH 8,0 hinzugegeben und die Reaktion 30 min. bei 25°C inkubiert. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 5 μ l 3x FAB-Puffer (verdünnt von 10x FAB-Puffer mit GAB-Puffer) induziert und die Reaktion für 30 min. bei 25°C inkubiert. Die Fraktionierung in G- und F-Aktin erfolgte wie oben beschrieben.

Für die Untersuchung des Einflusses von TU3A auf die Stabilität der Aktinfilamente sind diese durch Verdünnung depolymerisiert worden. Hierzu sind zunächst 16 μ M Aktin wie oben beschrieben polymerisiert worden. Dieser F-Aktin-Stock konnte für eine spätere Verwendung bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden. Zur Induktion der Depolymerisation sind die Aktinfilamente in GAB auf ein Endvolumen von 40 μ l verdünnt worden, zu dem das Testprotein in 10 μ l 5 mM Tris-HCl pH 8,0 gegeben wurde. Die Depolymerisation erfolgte für 1 h bei 25°C und die Fraktionierung wie oben beschrieben.

3.5.9 Aktinpolymerisationsassay

Die Kinetik der Aktinpolymerisation wurde durch die Verwendung von Pyren-markiertem Aktin untersucht. Das an Aktin gekoppelte Fluorophor Pyren emittiert nach Anregung bei 365 nm eine Fluoreszenz bei 407 nm, dessen Intensität größer ist, wenn sich Aktin in einem polymerisierten Zustand befindet. Somit wurde die Kinetik der Aktinpolymerisation durch einen Anstieg der Fluoreszenz bei 407 nm ermittelt.

Hierfür wurde β -Aktin mit 1/10 Pyren-markiertem α -Aktin aus dem Muskel (Cytoskeleton) in GAB-Puffer 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (1 h, 34.000 rpm in Beckman SW-60 Ti Rotor, 4°C) und der Überstand für die Polymerisierung verwendet. Die Polymerisierungsreaktionen mit 70 μ l der Pyrene-Aktin-Mischung und 20 μ l des Testproteins (in 5 mM Tris-HCl pH 8,0) wurde für 10 min. bei 25°C inkubiert bevor die Polymerisation durch Zugabe von 10 μ l 3x FAB-Puffer induziert wurde. Die Fluoreszenzintensität des Pyren-markierten Aktin bei 407 nm (Excitation bei 365 nm) ist in einem Fluoreszenzspektrometer (Excitationsfilter 340nm, Bandbreite 30nm; Emissionsfilter 410nm, Bandbreite 10nm) gemessen worden.

3.5.10 F-Aktin-Visualisierungsassay

Um die Struktur von *in vitro* gebildeten Aktinfilamenten zu analysieren, wurden diese nach einem Protokoll basierend auf Blanchoin *et al.* (2000) gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierzu wurden 8 μM teilweise Pyren-markierte Aktinfilamente aus dem Aktinpolymerisationsassay nach 2 h Polymerisation bei 25°C mit 8 μM Alexa 546-Phalloidin (Invitrogen) fixiert, indem 18,2 μl einer 6,6 μM Phalloidinlösung in Methanol verdampft und der zurückbleibende Feststoff mit 15 μl des Reaktionsgemisches aus dem Aktinpolymerisationsassays resuspendiert wurde. Nach Inkubation für 10 min. bei 25°C sind die fixierten Filamente in Fluoreszenzpuffer (10 mM Imidazol pH 7,0, 50 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 100 mM DTT, 100 $\mu\text{g/ml}$ Glucoseoxidase, 3 mg/ml Glucose, 20 $\mu\text{g/ml}$ Catalase, 0,5% Methylcellulose, 4000 centipoise) zu einer Endkonzentration von 10 nM verdünnt worden. 2 μl der Reaktion wurden zwischen Poly-D-Lysine beschichteten Objektträgern und einem Deckgläschen gegeben und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) visualisiert und dokumentiert.

4 Ergebnisse

4.1 Eine umfassende Analyse von TPR-Cofaktoren als Determinanten der Funktion von Steroidhormonrezeptoren

4.1.1 Untersuchungen zur Responsivität der Steroidhormonrezeptoren

Um die Effekte von verschiedenen TPR-Proteinen auf die transkriptionelle Aktivierung von Steroidhormonrezeptoren (SR) zu untersuchen, wurde ein Reportersystem verwendet, welches eine Fireflyluciferase in Abhängigkeit der Aktivierung eines SR exprimiert. Als Maß für die Rezeptoraktivität wird die durch die Luciferase katalysierte Lumineszenzreaktion verwendet, die durch Messung des in der Umsetzung von Luciferin entstehenden Lichts quantifiziert wird. In dem verwendeten System wurden HA-markierte SR in SK-N-MC Zellen überexprimiert. Der jeweilige Rezeptor bindet nach Stimulation mit Hormon an einen Promotor, der Bindestellen (*engl.* hormone response elements, HREs) für den als Transkriptionsfaktor agierenden Rezeptor besitzt und induziert so die Expression der Fireflyluciferase. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Reporterplasmide mit jeweils verschiedenen Promotorsequenzen verwendet. Für die Messung der Aktivität des Androgenrezeptors (AR), Glucocorticoidrezeptors (GR), Mineralocorticoidrezeptors (MR) und des Progesteronrezeptors (PR) wurde ein Reporterplasmid mit dem MMTV (*engl.* mouse mammary tumor virus)-Promotor verwendet, der HREs enthält, an welche die oben genannten Rezeptoren binden können. Für die Messung der Aktivität der Estrogenrezeptoren (ER) ER α und ER β wurde ein Reporterplasmid verwendet, das einen Promotor mit spezifischen Bindestellen für den ER, sogenannte EREs (*engl.* estrogen response elements) enthält. Um die Responsivität der Rezeptoren auf die Stimulation mit einem Hormon zu untersuchen, wurden SK-N-MC Zellen, die mit den Reporterplasmiden sowie einem HA-gekoppeltem SR transfiziert waren, mit ansteigenden Hormonkonzentrationen stimuliert. Nach Stimulation zeigten alle Rezeptoren einen von der Dosis abhängigen Anstieg der transkriptionellen Aktivität. Das Ausmaß des Anstiegs der Fireflywerte nach Stimulation mit saturierenden Konzentrationen von Hormon im Vergleich zu den Werten in Abwesenheit von Hormon entspricht der Induzierbarkeit eines Rezeptors. Die verschiedenen Rezeptoren unterscheiden sich sowohl in ihrer Hintergrundaktivität ohne Zugabe des jeweiligen Hormons als auch in dem Ausmaß der Induzierbarkeit durch Hormonstimulation (Abb. 3).

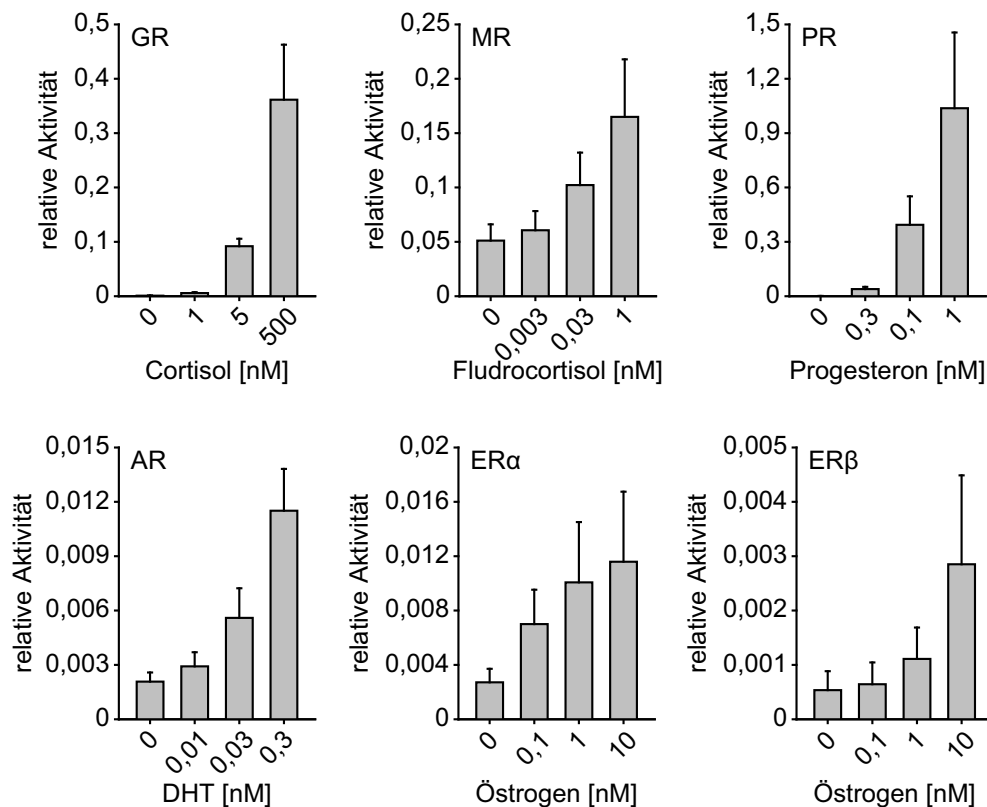


Abb. 3 Steroidhormonrezeptoren unterscheiden sich in der Aktivierung der Reportersysteme

SK-N-MC Zellen wurden mit einer Kombination aus folgenden Plasmiden transfiziert: Ein für einen HA-gekoppelten SR kodierendes Plasmid, ein für die Gaussia-KDEL-Luciferase kodierendes Kontrollplasmid sowie ein Reporterplasmid. Bei GR, MR und PR wurde das MMTV-Luc und bei ER α und ER β das ERE-Luc Reporterplasmid verwendet. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in Anwesenheit von Hormon wie angegeben oder EtOH als Kontrolle kultiviert. Gezeigt sind die mit den Gaussia-Luciferase normalisierten Fireflyluciferase Werte (+SEM) aus mindestens vier unabhängigen Einzelexperimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Bei dem PR wurde im Mittel ein 1000-facher Anstieg und beim GR ein knapp 400-facher Anstieg der Fireflywerte nach Stimulation bei Hormonkonzentrationen in der Sättigung gemessen, wodurch diese Rezeptoren im Vergleich zu den anderen SR die stärkste von der Hormonkonzentration abhängige Induzierbarkeit zeigten. Bei dem MR und dem AR wurde ein 3,2-facher bzw. 5,5-facher Anstieg der Firefly Werte und somit eine geringere Induzierbarkeit als bei dem PR und dem GR gemessen. Die Aktivitäten des GR, PR und AR zeigten keine Unterschiede in Abwesenheit von Hormon. Interessanterweise wurden im Vergleich zu den anderen Rezeptoren, die mit dem Reporter MMTV-Luc gemessen worden sind, beim MR hohe basale Fireflywerte in Abwesenheit von Hormon gemessen. Die

Aktivitäten des ER α und ER β wurden mit dem Reporter ERE-Luc gemessen, so dass die Fireflywerte dieser Rezeptoren nicht direkt mit den Fireflywerten der Rezeptoren verglichen werden kann, die mit dem MMTV-Luc gemessen worden sind. Die Induzierbarkeit nach Stimulation mit der saturierenden Hormonkonzentration von 10 nM Östrogen war beim ER α bei 4,3-fach und beim ER β 5,3-fach (Abb. 3, ER α +ER β) und war somit vergleichbar mit der Induzierbarkeit des AR und des MR.

Dieser Vergleich zeigt, dass sich die untersuchten SR in den verwendeten Reportersystemen sowohl in der basalen Aktivität als auch in ihrer Responsivität nach Hormonstimulation unterscheiden.

4.1.2 TPR-Proteine beeinflussen die SR-Aktivität unterschiedlich

Um den Einfluss der verschiedenen TPR-Proteine auf die Aktivität der SR zu untersuchen, wurden die TPR-Proteine zusammen mit dem zu untersuchenden Rezeptor coexprimiert und die Aktivität des Rezeptor mittels des Reportersystems wie in Kapitel 4.1.1 gemessen. Die TPR-Proteine wurden als FLAG-Fusion überexprimiert, damit die relative Expression mittels FLAG-Immunoblot kontrolliert werden konnte. Es zeigte sich, dass die Überexpression einiger TPR-Proteine einen negativen modulatorischen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität der Rezeptoren hatte, wenn diese mit subsaturierenden Hormonkonzentrationen stimuliert wurden. Dieser inhibitorische Effekt einzelner TPR-Proteine war am stärksten bei Rezeptoren, die eine hohe Aktivität im MMTV-Reportersystem hatten. Rezeptoren, wie der im MMTV-Reportersystem nur schwach aktivierte AR sowie die nur moderat induzierbaren ER α und ER β wurden in einem geringeren Ausmaß durch die Überexpression einzelner TPR-Proteine beeinflusst als GR, MR und PR. Ein stimulatorischer Effekt auf die Rezeptoraktivität nach Überexpression der TPR-Proteine wurde, verglichen zu den inhibitorischen Effekten, nur in sehr geringem Ausmaß gemessen (Abb. 4 - Abb. 6).

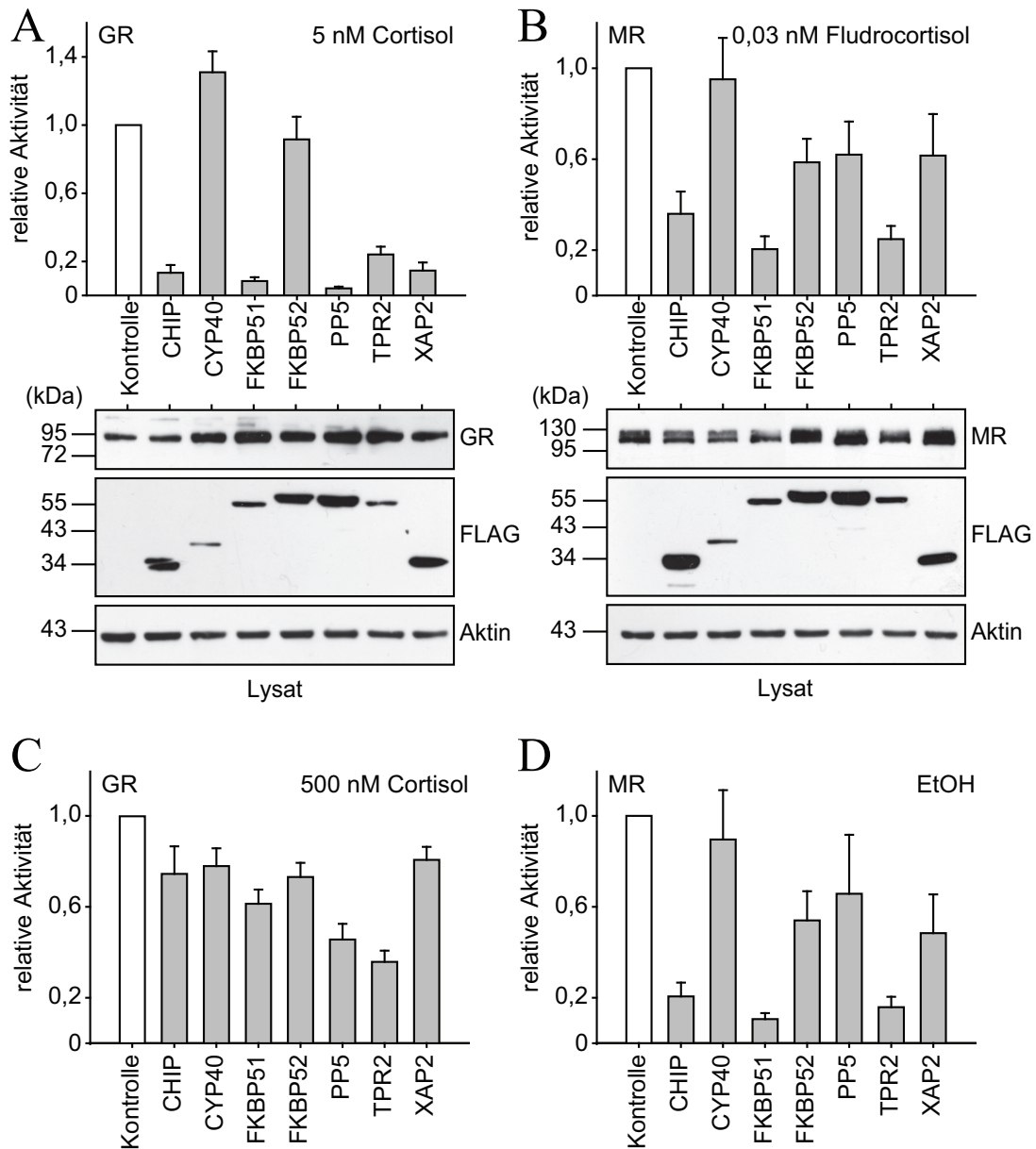


Abb. 4 TPR Proteine beeinflussen die Aktivität des GR und MR

SK-N-MC Zellen wurden mit einer Kombination aus Plasmiden wie in Abb. 3 sowie einem für ein FLAG-gekoppeltes TPR-Protein kodierendes Plasmid transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in Anwesenheit von Hormon wie angegeben oder EtOH als Kontrolle kultiviert. (A+B oben, C+D) Relative Rezeptoraktivität repräsentiert die mit den Gaussiwerten normalisierten Fireflyluciferaseaktivitäten, dargestellt als relative Stimulation (+SEM) von mindestens vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. (A+B unten) Immunblot (IB) Analyse von Zellextrakten (Lysat) zeigt Rezeptoren mittels HA-IB, TPR-Cofaktoren mittels FLAG-IB und Aktin-IB als Ladekontrolle.

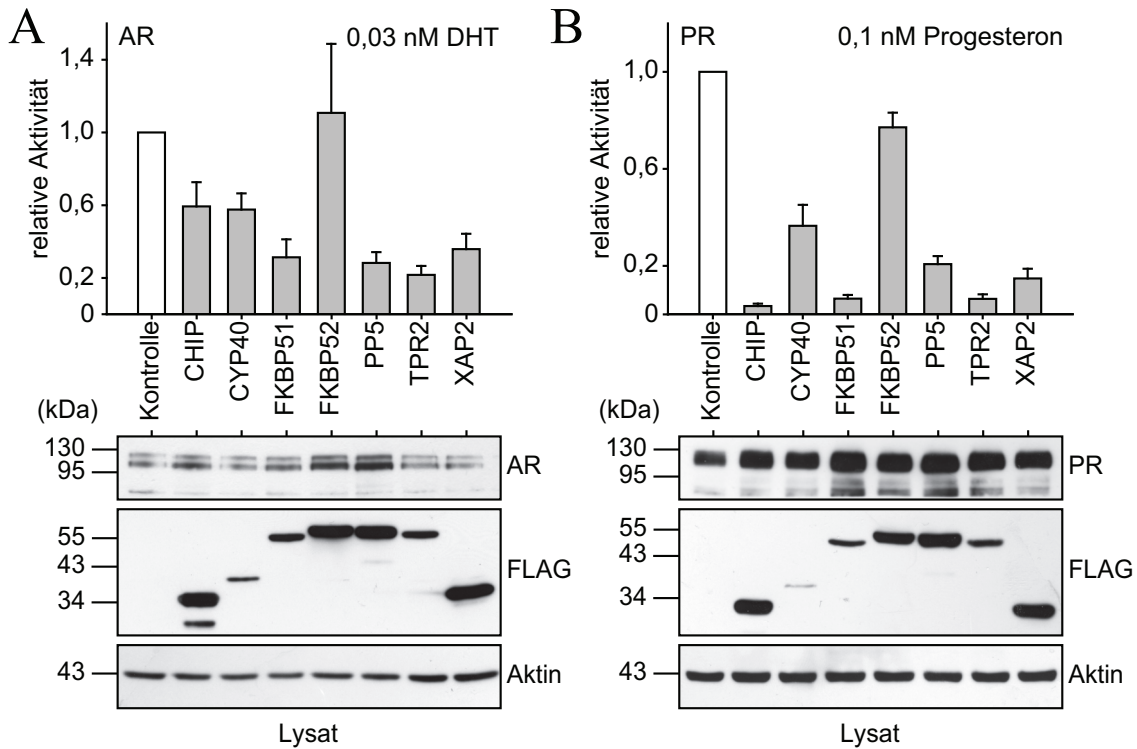


Abb. 5 TPR Proteine beeinflussen die Aktivität des AR und PR

SK-N-MC Zellen wurden mit einer Kombination aus Plasmiden wie in Abb. 3 sowie einem für ein FLAG-gekoppeltes TPR-Protein kodierendes Plasmid transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in Anwesenheit von Hormon wie angegeben oder EtOH als Kontrolle kultiviert. (A+B oben) Relative Rezeptoraktivität repräsentiert die mit den Gaussiwerten normalisierten Fireflyluciferaseaktivitäten, dargestellt als relative Stimulation (+SEM) von mindestens vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. (A+B unten) Immunblot (IB) Analyse von Zellextrakten (Lysat) zeigt Rezeptoren mittels HA-IB, TPR-Cofaktoren mittels FLAG-IB und Aktin-IB als Ladekontrolle.

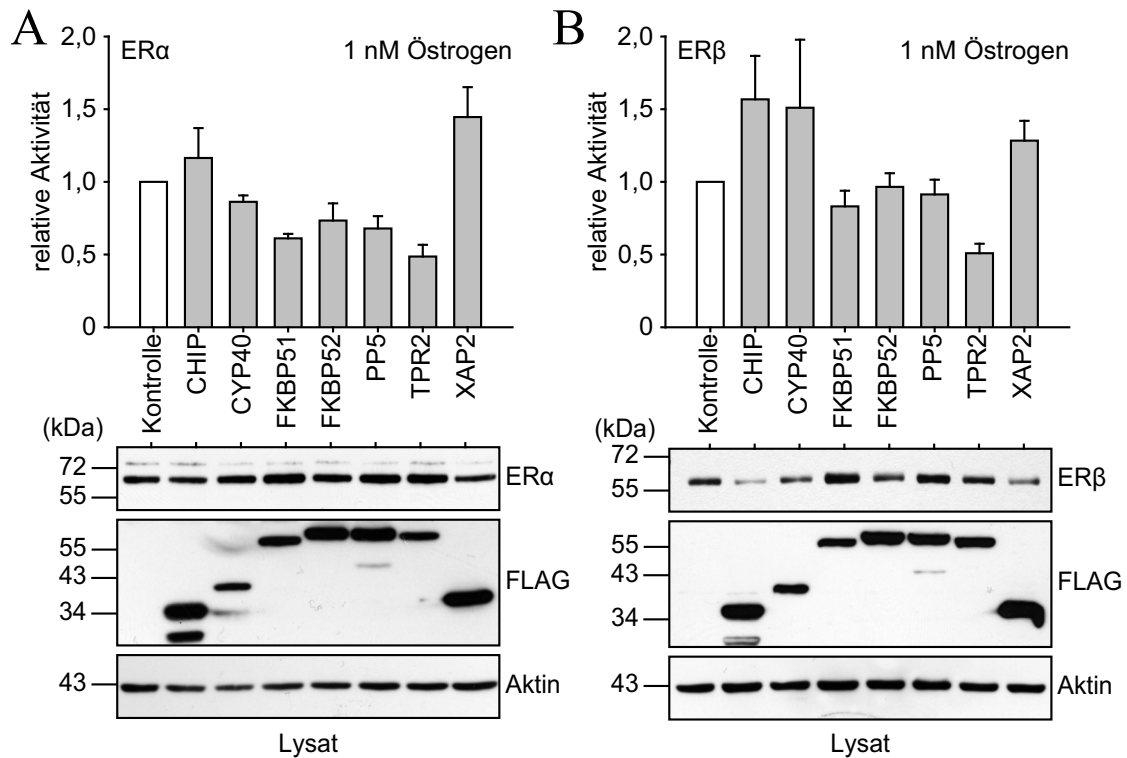


Abb. 6 TPR Proteine beeinflussen die Aktivität des ER α und ER β

SK-N-MC Zellen wurden mit einer Kombination aus Plasmiden wie in Abb. 3 sowie einem für ein FLAG-gekoppeltes TPR-Protein kodierendes Plasmid transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in Anwesenheit von Hormon wie angegeben oder EtOH als Kontrolle kultiviert. (A+B oben) Relative Rezeptoraktivität repräsentiert die mit den Gaussiawerten normalisierten Fireflyluciferaseaktivitäten, dargestellt als relative Aktivität (+SEM) von mindestens vier unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. (A+B unten) Immunblot (IB) Analyse von Zellextrakten (Lysat) zeigt Rezeptoren mittels HA-IB, TPR-Cofaktoren mittels FLAG-IB und Aktin-IB als Ladekontrolle.

Es wurde bereits gezeigt, dass die E3 Ubiquitinligase CHIP (*engl.* C-terminus of Hsc70 interacting protein) die hormonabhängige Aktivierung des GR und des AR inhibiert, indem der proteasomale Abbau der Rezeptoren verstärkt wird (He, 2004; Connell, 2001). In unserem System konnten ebenfalls inhibitorische Effekte gemessen werden. Ein Vergleich des Effekts auf die verschiedenen Rezeptoren zeigte, dass CHIP den stärksten Einfluß auf die Transaktivierung von GR und PR hat (Abb. 4, A + Abb. 5, B), jedoch einen nur moderaten auf den MR und AR (Abb. 4, B + Abb. 5, A). Wie der HA-Immunoblot zeigt, wurden keine signifikanten Veränderungen im Expressionslevel der verschiedenen Rezeptoren nach CHIP Überexpression beobachtet. Diese Beobachtung zeigt, dass CHIP die durch SR vermittelte Transkription auch dann beeinflussen kann, wenn Unterschiede im Expressionslevel des Rezeptors schwächer sind und diese mittels Immunoblot nicht nachgewiesen werden können. Aus Gründen, die nicht geklärt werden konnten, wurden jedoch Schwankungen in der Stärke des HA-Immunoblotsignals, das die Rezeptorexpression nachweist, beobachtet. Die Richtung und das Ausmass der Schwankungen folgten jedoch einem zufälligen Muster und konnten kausal nicht der Überexpression eines TPR-Proteins oder eines Rezeptors zugeordnet werden.

Die PPIase Cyp40 (Cyclophilin 40) wurde bereits in SR-Heterokomplexen identifiziert, wodurch die Möglichkeit besteht, dass dieser Faktor auch die Rezeptorfunktion beeinflussen kann (Hoffmann, 1995). Der Einfluss von Cyp40 auf die durch SR vermittelte Transaktivierung in Säugetierzellen wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. In den hier durchgeführten Experimenten wurde nach Überexpression von Cyp40 keine signifikanten Veränderungen in der Rezeptoraktivierung beobachtet. Die Aktivität des AR und des PR wurde leicht inhibiert und es wurde ein leichter, stimulatorischer Effekt auf die Aktivierung des GR beobachtet (Abb. 4, A + Abb. 5).

Obwohl der Einfluss von FKBP51 und FKBP52 auf SR bereits vielfältig untersucht wurde, ist ein umfassender Vergleich der Effekte dieser Immunophiline auf die Aktivierung aller SR bisher noch nicht durchgeführt worden. Die Überexpression von FKBP51 bewirkte einen negativ modulatorischen Effekt auf die Aktivierung aller SR, die in dieser Studie untersucht wurden. Dieser inhibitorische Effekt war am stärksten beim GR und beim PR. Wie bereits für den GR publiziert (Wochnik, 2005), beeinflusste FKBP52 auch in diesem System nicht die Aktivierung dieses Rezeptors (Abb. 4, A). Die Überexpression von FKBP52 zeigte auch keinen Einfluss auf den PR, AR und ER, jedoch zeigte sich ein leichter negativ modulatorischer Effekt auf die Transaktivierung des MR (Abb. 4 - Abb. 6).

Die Proteinphosphatase 5 (PP5) wurde ebenso bereits als Modulator der steroidhormonabhängigen Transaktivierung beschrieben, wobei die Ergebnisse nicht

vollständig konsistent sind (Chen, 1996; Ikeda, 2004; Zhou, 2004; Wang, 2007). In der vorliegenden Studie wurde der Effekt des Volllängen-PP5 auf die Aktivität der SR in Säugetierzellen untersucht. Die Überexpression von PP5 führte zu einer starken Reduktion der Aktivität des AR, GR und PR (Abb. 4 + Abb. 5). Die Aktivierung des MR wurde nur moderat durch PP5 beeinflusst. Ein Einfluss von PP5 auf die durch die ER vermittelte Transkription konnte in unserem System nicht gezeigt werden (Abb. 6).

TPR2 (*engl.* J-domain containing cochaperone) stimuliert die Freigabe von Hsp90 Substraten. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Überexpression als auch eine Reduzierung der TPR2-Proteinlevel, zu einer Inhibierung der Aktivität des PR und des GR führt (Brychzy, 2003; Moffatt, 2008). In der vorliegenden Studie führte die Überexpression von TPR2 zu einer starken Reduktion der transkriptionellen Aktivität aller untersuchten SR. Im Vergleich zu den anderen untersuchten TPR-Proteinen zeigte TPR2 den stärksten inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des ER α und ER β (Abb. 6). Interessanterweise zeigte TPR2 auch einen negativ modulatorischen Effekt auf die Aktivität der Rezeptoren bei saturierenden Hormonkonzentrationen (Abb. 4, C).

XAP2 (*engl.* Hepatitis virus B X-associated protein 2) ist als Regulator des AhR bekannt (Ma, 1997; Meyer, 1998; Miller, 2002). Vor kurzem wurde XAP2 als negativ wirkender Modulator der GR-vermittelten Transaktivierung publiziert (Laenger, 2009). Der Einfluss von XAP2 auf die transkriptionelle Aktivität der anderen SR ist bisher noch nicht untersucht worden. Neben dem GR wurde in den hier durchgeführten Analysen zudem der AR und PR durch XAP2-Überexpression inhibiert (Abb. 5). Interessanterweise wurde der MR nur moderat durch XAP2 beeinflusst (Abb. 4, B).

4.1.3 PP5 differenziert zwischen den beiden hoch homologen Rezeptoren GR und MR

Die Überexpression von PP5 zeigte einen starken Effekt auf die transkriptionelle Aktivität des GR, aber einen nur moderaten Effekt auf die MR-Aktivität. Da Glucocorticoide im ZNS sowohl den MR als auch den GR aktivieren (De Kloet, 1998), könnte ein Faktor, der diese Rezeptoren differentiell beeinflusst, ein wichtiger Regulator der physiologischen Glucocorticoideffekte im ZNS sein. Um den differentiellen Einfluss von PP5 auf die Aktivität des MR und des GR zu untersuchen, wurden ansteigende Mengen von PP5 überexprimiert.

Eine Titration der PP5 exprimierenden Plasmide ergab bei der Untersuchung der Reporteragenaktivität des MR und des GR, dass PP5 den GR selbst bei einer geringen Menge von 10 ng inhibierte. Die MR-vermittelte Transaktivierung wurde im Vergleich hierzu erst bei der höchsten Plasmid-Menge von 200 ng moderat inhibiert (Abb. 7, A). Eine Immunoblotanalyse zeigte, dass der drastischen Unterschied in der Inhibition der Reporteragenaktivität nicht auf unterschiedliche Expressionslevel von PP5 zurückzuführen ist (Abb. 7, B).

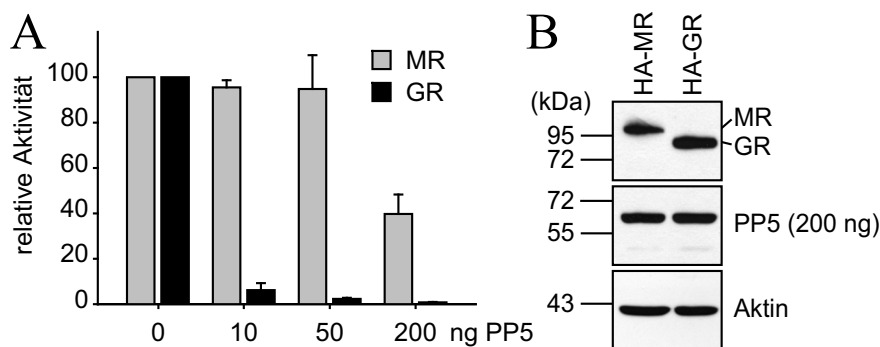


Abb. 7 PP5 inhibiert die Aktivität des GR stärker als die des MR

SK-N-MC Zellen wurden mit einer Kombination aus Plasmiden wie in Abb. 3 sowie ansteigenden Mengen von Plasmiden, die FLAG gekoppeltes PP5 exprimieren, transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen in steroidfreiem Medium kultiviert und mit 0,03 nM Fludrocortisol (MR) oder 5 nM Cortisol (GR) für 24 h stimuliert. (A) Fireflyluciferase-daten wurden mit den Gaussiaaktivitäten normalisiert und dargestellt als relative Aktivität von drei unabhängigen Experimenten (+SEM), die in Triplikaten durchgeführt wurden. (B) Immunoblotanalyse (IB) von Zellextrakten (Lysat) zeigt die Expression der Rezeptoren (IB: HA) und die PP5 (IB: FLAG) Expression, sowie Aktin als Ladekontrolle.

4.1.4 Cyp40 kann den inhibitorischen Effekt von FKBP51 nicht aufheben

In den unter Kapitel 4.1.2 zusammengefassten Reporteranalysen zeigte Cyp40, ähnlich wie FKBP52, keinen Effekt auf die Transaktivierung des GR (Abb. 4, A). Diese Beobachtung kann auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass Cyp40 keinen Einfluss auf die Aktivierung des Rezeptors vermittelt, oder dass potentielle positiv modulatorische Effekte in diesem Reportersystem so nicht gemessen werden können, da die Rezeptoren bereits maximal aktiv sind. Unter der Annahme, dass die TPR-Proteine um die Bindung an den Hsp90-Heterokomplex konkurrieren, konnte für FKBP52 ein positiv modulatorischer Effekt auf den GR gezeigt werden, wenn dessen Aktivität zuvor durch Überexpression von FKBP51 inhibiert wurde (Wochnik, 2005). Um zu untersuchen ob analog dazu Cyp40 einen positiv modulatorischen Effekt auf die SR Aktivität besitzt, wurde FKBP51 in konstanter Menge überexprimiert, während gleichzeitig ansteigende Mengen an Cyp40 exprimierenden Plasmiden transfiziert wurden. Unter den hier untersuchten Bedingungen reichte die maximale Menge an Cyp40 nicht aus, um den durch FKBP51 vermittelten inhibitorischen Effekt auf die GR-Aktivität aufzuheben (Abb. 8, A, *oben*). In der Immunoblotanalyse mittels FLAG Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die Cyp40-Expression in Abhängigkeit der transfizierten Plasmidmenge anstieg, wobei FKBP51 konstant coexprimiert wurde (Abb. 8, A, *unten*). In einem weiteren Experiment konnte Cyp40 auch nicht den durch FKBP51 vermittelten inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des MR aufheben (Abb. 8, C). Für den Beweis, dass ein inhibitorischer Effekt auf die Rezeptoraktivität, der durch die Überexpression eines TPR-Proteins vermittelt wurde, in diesem System durch die Coexpression eines anderen TPR-Proteins aufgehoben werden kann, wurde untersucht, ob FKBP52 die durch PP5 vermittelte Inhibition aufheben kann. Hierzu wurde PP5 in konstanter Menge überexprimiert, während ansteigende Mengen an FKBP52 exprimierenden Plasmiden cotransfiziert wurden. Hier wurde beobachtet, dass der inhibitorische Effekt von PP5 auf die Aktivität des GR durch Überexpression von FKBP52 aufgehoben werden kann (Abb. 8, B).

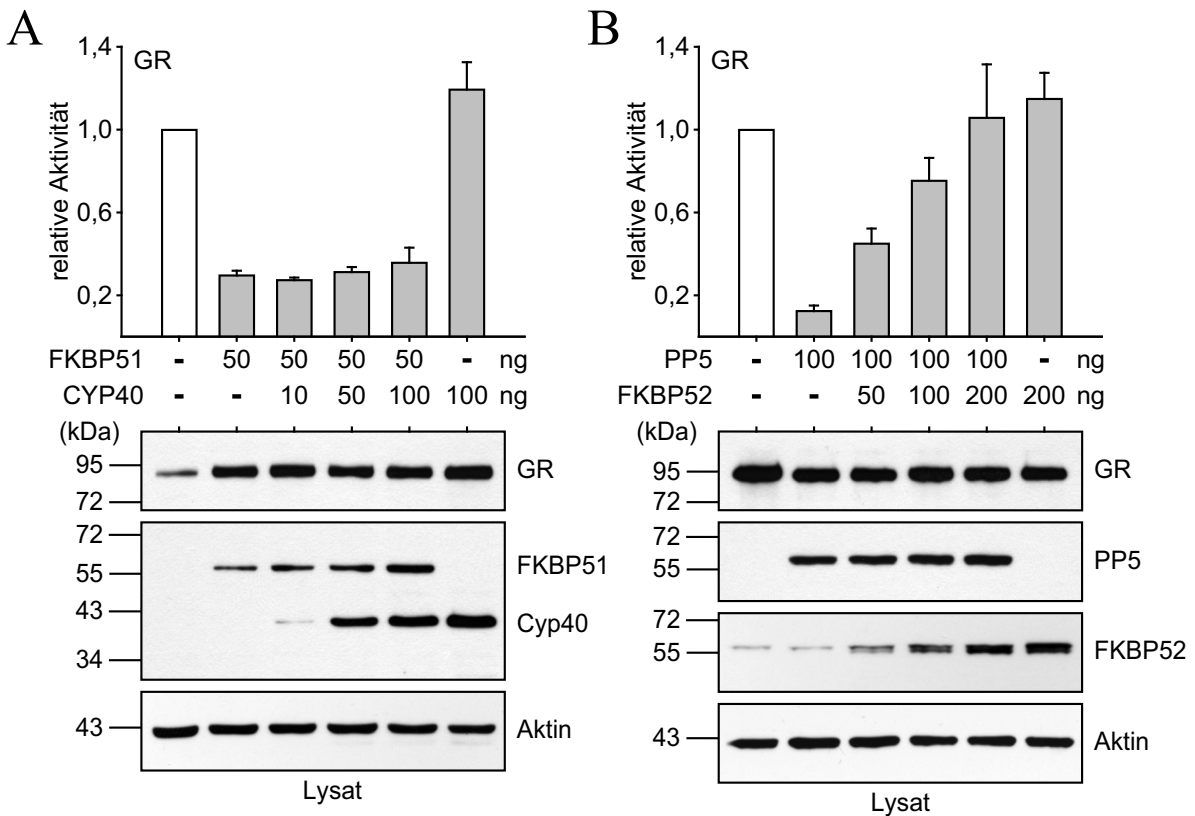


Abb. 8 Cyp40 kann den inhibitorischen Effekt von FKBP51 nicht aufheben

SK-N-MC Zellen wurden mit einer Kombination aus Plasmiden wie in Abb. 3 sowie variierenden Mengen von Plasmiden, die an FLAG gekoppelte TPR Proteine exprimieren transfiziert. (A+C) Cotransfektion von 50 ng eines FKBP51-FLAG exprimierenden Plasmids, sowie ansteigenden Mengen von Plasmiden, die an FLAG gekoppeltes

Cyp40 exprimieren. (B) Cotransfektion von 100 ng eines PP5-FLAG exprimierenden Plasmids sowie ansteigenden Mengen von Plasmiden, die FKBP52 exprimieren. Nach der Transfektion wurden die Zellen in steroidfreiem Medium kultiviert und mit 5 nM Cortisol (GR, A+B) oder 0,03 nM Fludrocortisol (MR, C) für 24 h stimuliert. (A+B oben, C). Fireflyluciferasedaten wurden mit den Gaussiaaktivitäten normalisiert und dargestellt als relative Aktivität von drei unabhängigen Experimenten (+SEM), die in Triplikaten durchgeführt wurden. (A+B unten) Immunoblot (IB)-Analyse von Zellextrakten (Lysat) zeigt GR mittels HA-IB, in (A) FKBP51 sowie Cyp40 mittels FLAG-IB und in (B) PP5 mittels FLAG-IB und FKBP52 mittels FKBP52-IB und Aktin-IB als Ladekontrolle.

4.1.5 PP5 benötigt die Interaktion mit Hsp90, jedoch nicht seine Phosphataseaktivität, um den GR zu inhibieren

PP5 ist die einzige, bisher identifizierte Phosphatase, die eine TPR-Domäne enthält. Aufgrund dieser Tatsache hat sich die Fragestellung ergeben, ob die Phosphataseaktivität von PP5 einen Einfluss auf die Rezeptoraktivierung in Säugetierzellen besitzt. In der Hefe wurde gezeigt, dass PP5 Hsp90 dephosphoryliert und dadurch einen positiv modulatorischen Effekt auf die Aktivität des GR besitzt (Wandinger, 2006). In unserem Reportersystem in Säugetierzellen besitzt PP5 einen negativ modulatorischen Effekt auf die GR-Aktivität. Um zunächst zu klären, ob die Interaktion mit Hsp90 notwendig für den inhibitorischen Effekt ist, wurde eine Punktmutation (R101A) innerhalb der TPR-Domäne eingefügt, von der bekannt ist, dass sie zu einem Verlust der Interaktion von PP5 mit Hsp90 führt (Russell, 1999). Im Gegensatz zu der WT-Form von PP5, führte die Überexpression der Hsp90-Interaktionsmutante (R101A) nicht zu einer Inhibition der GR Aktivität (Abb. 9, A). Durch Immunpräzipitation der PP5-R101A-Mutante konnte belegt werden, dass diese Mutation tatsächlich die Interaktion mit Hsp90 verhindert (Abb. 9, B). Die Beobachtung, dass bei PP5-R101A auch der GR nicht mehr copräzipitierte zeigte darüber hinaus, dass die Hsp90-Interaktion nicht nur für die Inhibition der GR-Aktivität, sondern auch für die Interaktion mit dem GR notwendig ist. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Phosphataseaktivität für die Inhibition der GR-Aktivität besitzt, wurde eine PP5-Mutante erstellt, die eine Punktmutation innerhalb der Phosphatasedomäne (H304A) enthält, von der bekannt ist, dass sie die Phosphataseaktivität aufhebt (Borthwick, 2001; Swingle, 2004). Daneben wurde eine PP5-Mutante erstellt, die eine Punktmutation innerhalb der TPR-Domäne enthält (E76A) und durch eine Reduktion des autoinhibitorischen Effekts der TPR-Domäne die basale Aktivität der Phosphatase erhöht (Kang, 2001). Interessanterweise wurde nach Überexpression sowohl der H304A- als auch der E76A-Mutante eine Reduktion der GR-Aktivität beobachtet, welche den inhibitorischen Effekt des WT noch übertraf (Abb. 9, A). Die Immunpräzipitation zeigte, dass diese PP5-Mutanten mit Hsp90 und dem GR interagieren. Jedoch wurde bei ähnlicher Expression und Präzipitation der einzelnen PP5-Mutanten bei der H304A-Mutante im Vergleich zum WT weniger Hsp90 und GR copräzipitiert und bei der E76A-Mutante mehr Hsp90 und GR.

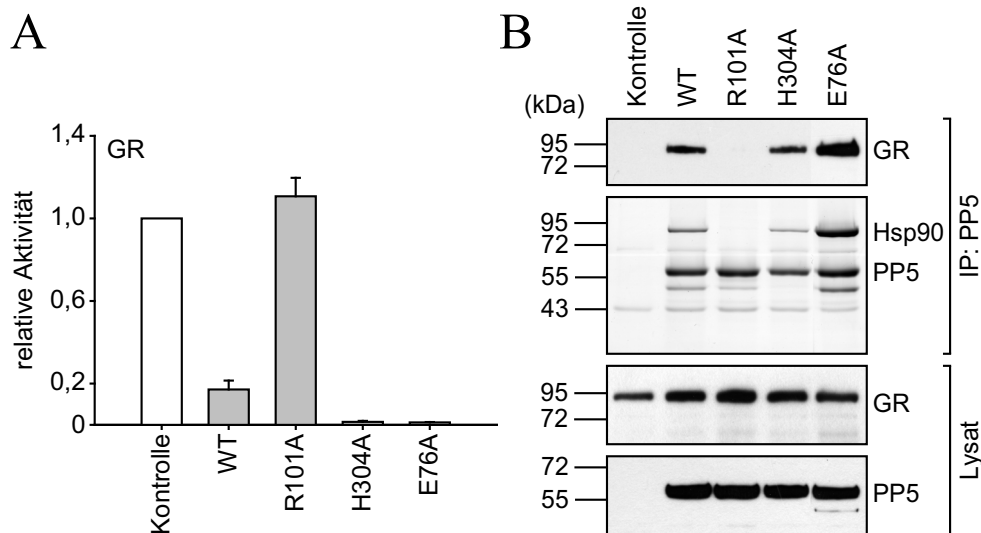


Abb. 9 Die PP5 Interaktion mit Hsp90 ist essentiell für die GR-Inhibition

(A) SK-N-MC Zellen wurden mit einer Kombination aus Plasmiden wie in Abb. 3 sowie Plasmiden, die verschiedene PP5-Mutanten exprimieren, transfiziert. WT: PP5-Wildtyp, R101A: PP5-TPR-Interaktionsmutante, H304A: PP5 ohne Phosphataseaktivität, E76A: PP5 mit verstärkter Phosphataseaktivität. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 nM Cortisol für 24 h stimuliert. (B) HEK-293 Zellen wurden mit 5 µg Plasmiden, die einen an HA gekoppelten GR und 5 µg Plasmiden, die eine an FLAG gekoppelte PP5-Mutante exprimieren, transfiziert und 72 h in steroidfreiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und PP5 mittels FLAG-Antikörper präzipitiert. Oben: Die Eluate der FLAG IP (IP: PP5) wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und das präzipitierte PP5 sowie das copräzipitierte Hsp90 mittels Coomassiefärbung nachgewiesen. Die Copräzipitation des GR wurde mittels HA-IB (GR) nachgewiesen. (Unten) IB von Zellextrakten (Lysat) zeigt GR mittels HA-IB, sowie PP5 mittels FLAG-IB.

Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Phosphataseaktivität mit der Affinität von PP5 an Hsp90 korreliert. Nennenswert ist auch die Beobachtung einer Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa unterhalb der PP5-Bande bei 58 kDa. Diese Bande wurde mittels Massenspektrometrie als PP5 identifiziert (Daten nicht gezeigt). Es muss sich um eine C-terminal prozessierte Form von PP5 handeln, da das überexprimierte PP5 eine N-terminale FLAG-Fusion enthält und diese Bande mittels FLAG-Antikörpern nachgewiesen werden kann. Durch Vergleich der 58 kDa Bande mit der bei 50 kDa zeigte sich, dass das Verhältnis der 50/58 kDa Banden mit der Phosphataseaktivität korrelierte. So wurde bei der E76A-Mutante ein erhöhtes Verhältnis im Vergleich zum WT beobachtet. Bei der H304A-Mutante war die 50 kDa Bande nicht nachweisbar.

4.1.6 TPR-Proteine werden unterschiedlich effizient in SR-Heterokomplexe inkorporiert

Durch ihre TPR-Domäne besitzen die in dieser Studie untersuchten Proteine potentiell die Möglichkeit mit SR-Heterokomplexen zu interagieren. Die verschiedenen TPR-Proteine konkurrieren um die Bindung an Hsp90 und demzufolge wird die Aktivität des Rezeptors als Hsp90-Klient durch die relative Anwesenheit der einzelnen TPR-Proteine determiniert. Die Unterschiede zwischen den Effekten der TPR-Proteine im Rezeptoraktivitätsassay könnten somit durch verschiedene Affinitäten der TPR-Proteine zu speziellen SR-Heterokomplexen erklärt werden.

Um zu untersuchen, ob und ggf. in welchem Ausmaß die einzelnen TPR-Proteine in die verschiedenen SR-Heterokomplexe inkorporieren, wurden Immunpräzipitationen (IP) durchgeführt, die ein Bindungsprofil der Steroidrezeptoren GR, MR, PR und AR zu den TPR-Proteinen generieren sollten. Hierzu wurden an HA gekoppelte SR (AR, GR, MR, PR) und an FLAG gekoppelte TPR-Proteine in HEK-293 Zellen coexprimiert und sowohl die Rezeptoren als auch die TPR-Proteine präzipitiert. Ausgehend von einem Ansatz, in dem 5 µg Plasmid für den Rezeptor und 5 µg des TPR-Proteins transfiziert wurden, sind die Plasmidmengen der TPR-Proteine so angepasst worden (3-10 µg Plasmid), dass diese in gleichen Mengen exprimiert wurden. Es zeigte sich, dass die Präzipitation der SR mittels HA-IP deutlich variierte. Diese Variabilitäten zeigten sich sowohl von Experiment zu Experiment, als auch in einem Experiment zwischen den einzelnen Transfektionen mit verschiedenen TPR-Proteinen. Die Präzipitation der TPR-Proteine mittels FLAG-IP war hingegen stabil. Jedoch zeigte sich, dass die einzelnen TPR-Proteine untereinander, obwohl sie vergleichbar exprimiert waren, unterschiedlich effizient präzipitiert wurden, wobei diese Unterschiede unabhängig von dem coexprimierten Rezeptor und konsistent zwischen den experimentellen Replikaten waren (Abb. 10 - Abb. 13, B *rechts* +C). Um diese Schwankungen in der Auswertung zu berücksichtigen, wurde zur Bestimmung der relativen Bindung der TPR-Proteine an die präzipitierten Rezeptoren das FLAG-Immunoblotssignal der Eluate aus der HA-IP mit dem HA-Immunoblotssignal aus dem Eluat und anschließend mit dem FLAG-Immunoblotssignal des Lysats normalisiert. Um im Vergleich dazu die relative Bindung der Rezeptoren an die präzipitierten TPR-Protein-Heterokomplexe zu bestimmen, wurde das HA-Immunoblotssignal der Eluate aus der FLAG-IP mit den Signalen der präzipitierten TPR-Proteine im coomassiegefärbten SDS-PAGE Gel normalisiert.

Für alle in der vorliegenden Studie untersuchten TPR-Proteine konnte die potentielle Interaktion mit dem GR, MR, PR und AR nachgewiesen werden. Bei der Präzipitation der

Rezeptoren unterschieden sich jedoch die copräzipitierten TPR-Proteine in ihrer Abundanz im Eluat. Die relative Abundanz der copräzipitierten Rezeptoren unterschied sich analog dazu bei der Präzipitation der TPR-Proteine. Diese Unterschiede in der Präzipitation lassen auf eine unterschiedlich effiziente Inkorporation der TPR-Proteine in die SR-Heterokomplexe schließen. Bei Betrachtung der Immunpräzipitationsexperimente aller hier untersuchten Rezeptoren zeigte sich, dass CHIP, FKBP51 und TPR2 in eine Gruppe gegliedert werden konnten, die stark in die Rezeptorkomplexe inkorporiert wurden. Im Vergleich zu dieser Gruppe wurden die restlichen TPR-Proteine schwächer in die Rezeptorkomplexe inkorporiert (Abb. 10 - Abb. 13). Die Analyse des GR zeigte, dass FKBP51 am stärksten mit den GR-Heterokomplexen interagiert, gefolgt von CHIP und TPR2. FKBP52 und PP5 wurden moderat inkorporiert und bei Cyp40 und XAP2 wurde vereinzelt eine schwache Interaktion detektiert (Abb. 10). Die Analyse des Bindungsprofils der zum GR homologen Rezeptoren MR (Abb. 11) und PR (Abb. 12) zeigte eine ähnliche Inkorporation der TPR-Proteine in die Heterokomplexe dieser Rezeptoren. Während FKBP51 mit dem GR, MR und PR am stärksten interagierte, zeigte ein Vergleich von CHIP und TPR2 beim GR eine leicht stärkere Bindung von TPR2, eine ausgeglichene Bindung beim MR und eine leicht stärkere Bindung von CHIP beim PR (Abb. 10 - Abb. 12.). Im Gegensatz zu dem GR, MR und PR zeigte das Bindungsprofil des AR die stärkste Interaktion mit TPR2, gefolgt von CHIP und FKBP51. Der AR inkorporierte die TPR-Proteine Cyp40, FKBP52, PP5 und XAP2 vergleichbar zu den anderen untersuchten SR (Abb. 13).

Zusammenfassend zeigte sich durch die Immunpräzipitationen, dass alle TPR-Proteine mit Heterokomplexen der untersuchten SR interagieren. Der Vergleich der relativen Bindung zeigte jedoch deutliche Unterschiede in der Effizienz dieser Interaktionen. CHIP, FKBP51 und TPR2 wurden effizienter inkorporiert als Cyp40, FKBP52, PP5 und XAP2.

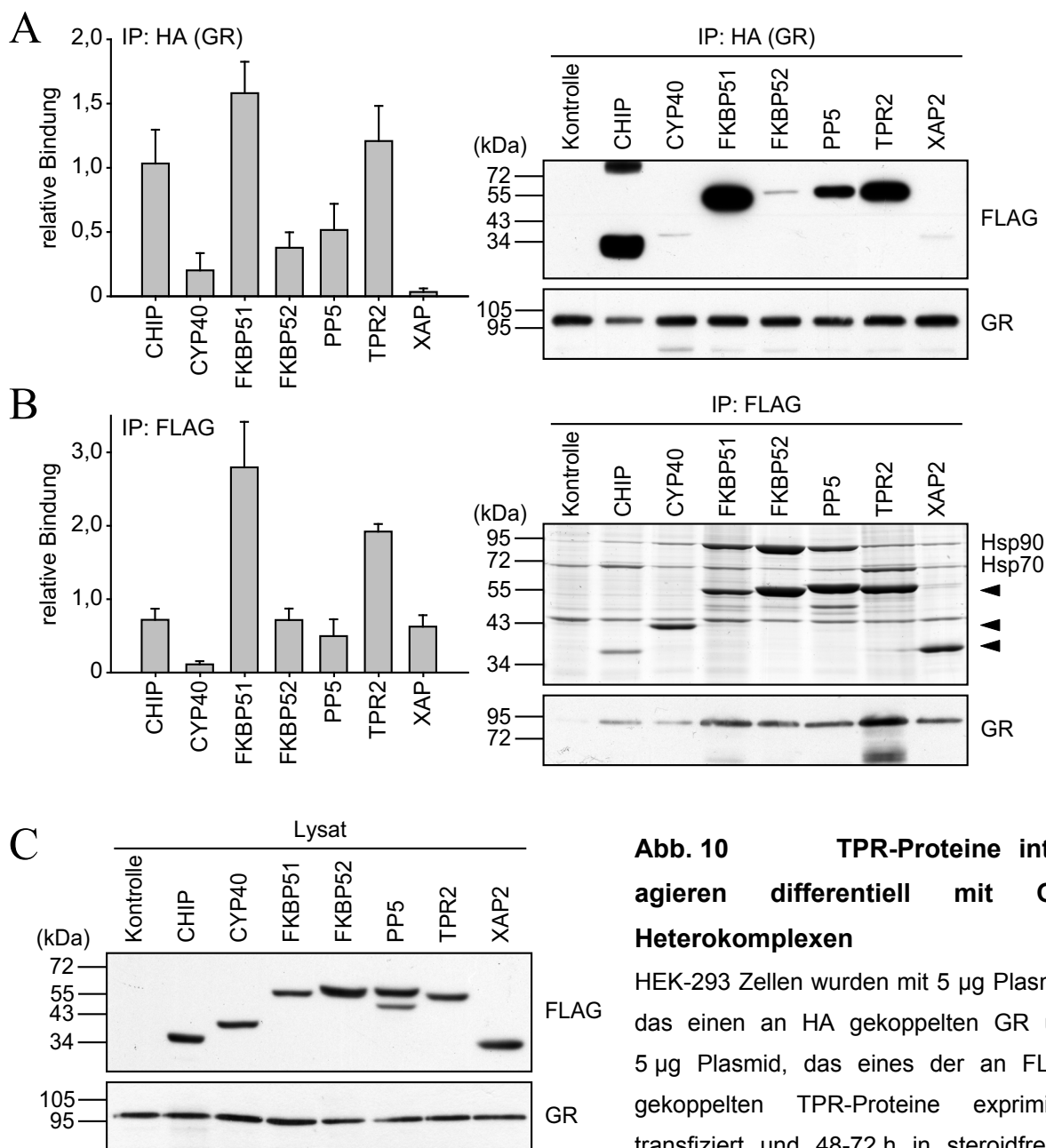


Abb. 10 TPR-Proteine interagieren differenziell mit GR-Heterokomplexen

HEK-293 Zellen wurden mit 5 μ g Plasmid, das einen an HA gekoppelten GR und 5 μ g Plasmid, das eines der an FLAG gekoppelten TPR-Proteine exprimiert, transfiziert und 48-72 h in steroidfreiem

Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und der GR mittels HA-Antikörper (A) sowie die TPR-Proteine mittels FLAG-Antikörper (B) immunpräzipitiert. (A) HA-IP (GR). *Links*: Quantifizierung der relativen Bindung der TPR-Proteine an die präzipitierten GR-Heterokomplexe relativ zum Mittelwert der Bindung von CHIP, FKBP51, FKBP52, PP5 aus drei Einzelexperimenten (+SEM). *Rechts*: Repräsentative Immunoblot (IB) Analyse der Eluate zeigt copräzipitierte TPR-Proteine mittels FLAG-IB und präzipitierten GR mittels HA-IB. (B) FLAG-IP. *Links*: Quantifizierung der relativen Bindung des GR an die präzipitierten TPR-Proteine aus drei Einzelexperimenten (+SEM). *Rechts, oben*: Repräsentatives coomassiegefärbtes SDS-PAGE-Gel der Eluate zeigt präzipitierte TPR-Proteine (Pfeilspitzen) und copräzipitiertes Hsp90 sowie Hsp70. *Rechts, unten*: Repräsentative IB Analyse der Eluate zeigt copräzipitierten GR mittels HA-IB. (C) IB Analyse von Zellextrakten (Lysat) zeigt GR mittels HA-IB sowie TPR-Protein-Expression mittels FLAG-IB.

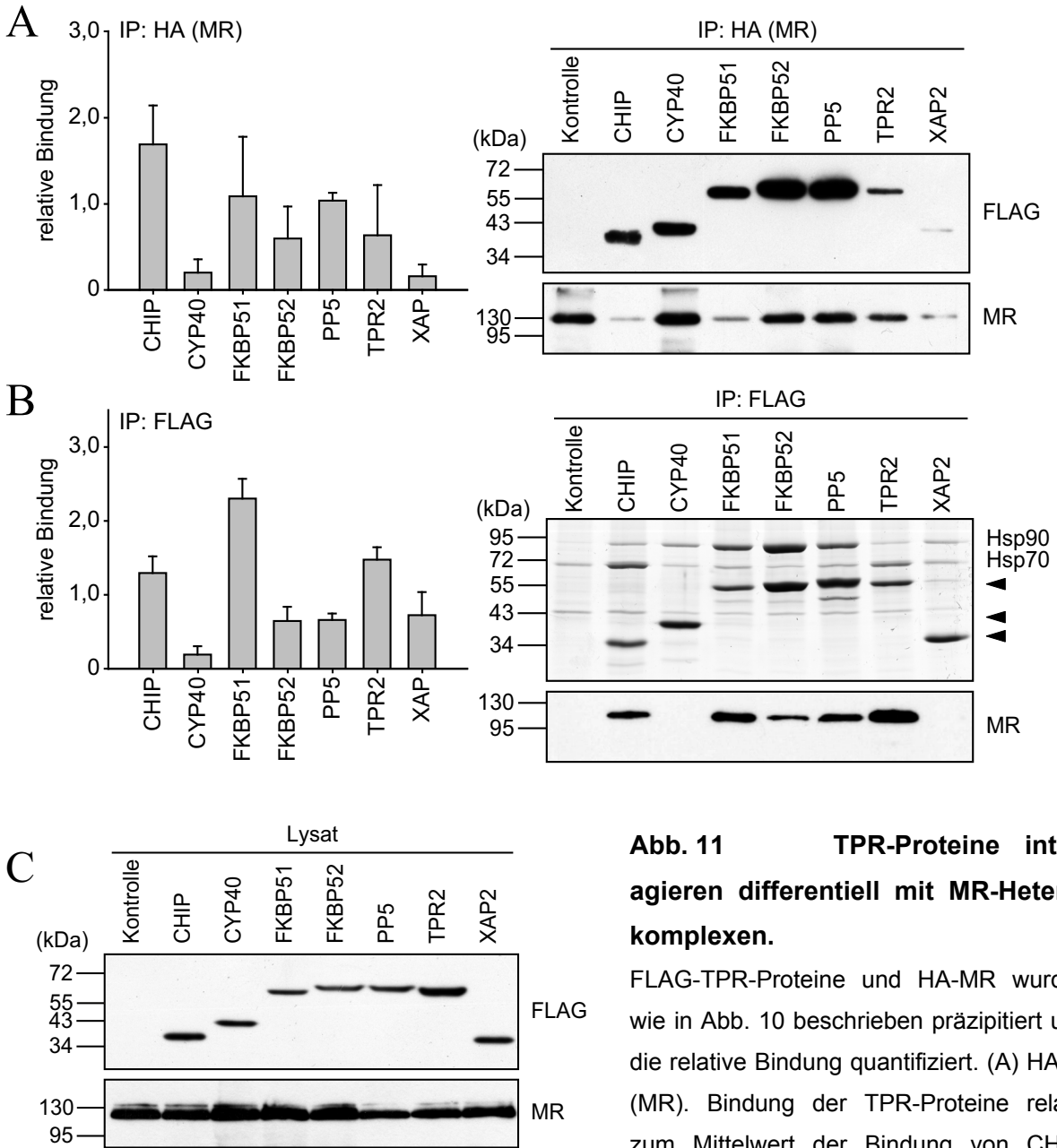


Abb. 11 TPR-Proteine interagieren differentiell mit MR-Heterokomplexen.

FLAG-TPR-Proteine und HA-MR wurden wie in Abb. 10 beschrieben präzipitiert und die relative Bindung quantifiziert. (A) HA-IP (MR). Bindung der TPR-Proteine relativ zum Mittelwert der Bindung von CHIP,

FKBP51, FKBP52 und PP5 von drei Einzelexperimenten, zwei bei TPR2 (+SEM). (B) FLAG-IP Bindung des MR an die präzipitierten TPR-Proteine aus drei Einzelexperimenten (+SEM). (C) IB Analyse von Zellextrakten (Lysat) zeigt MR mittels HA-IB sowie TPR-Protein-Expression mittels FLAG-IB.

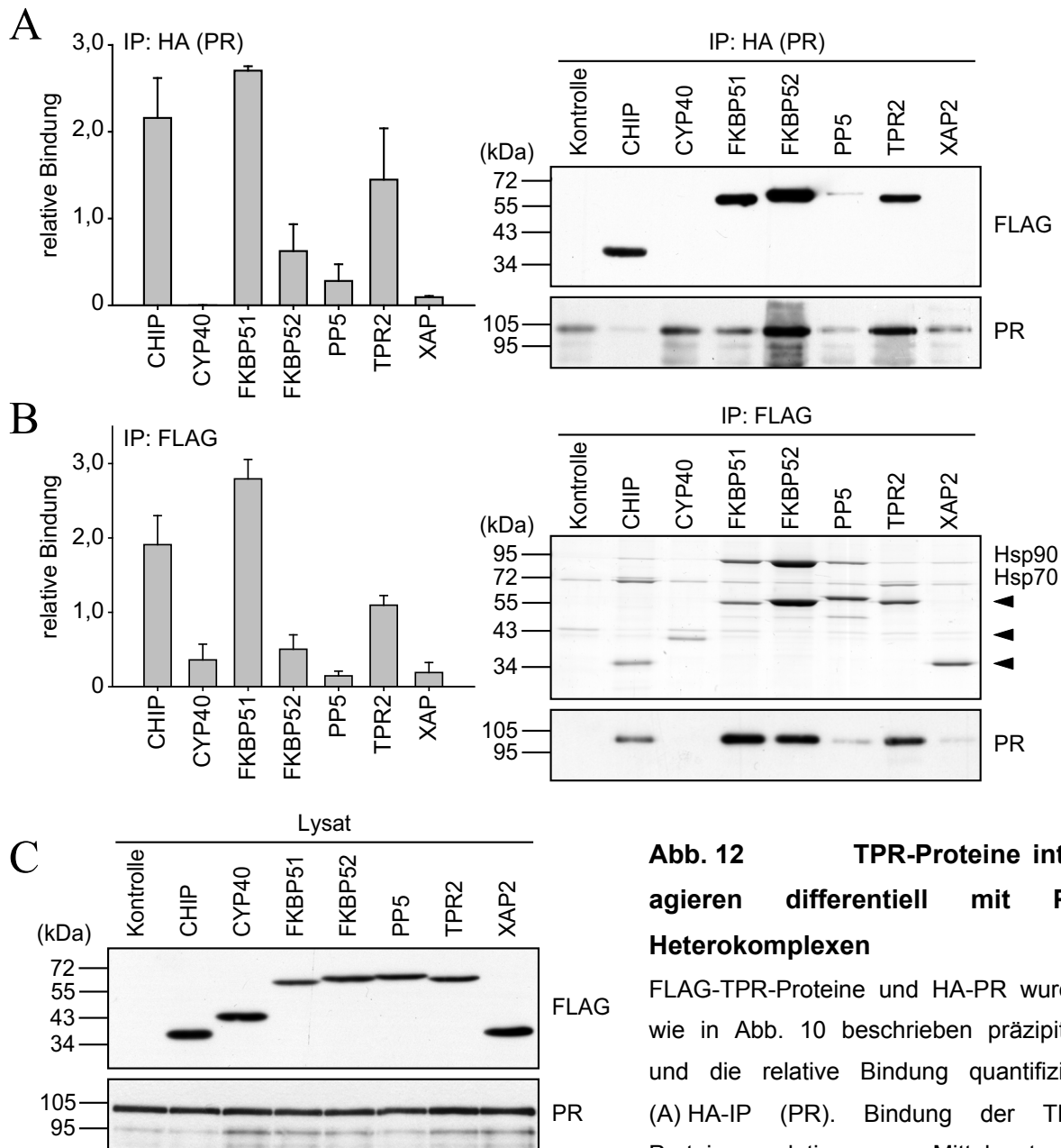


Abb. 12 TPR-Proteine interagieren differentiell mit PR-Heterokomplexen

FLAG-TPR-Proteine und HA-PR wurden wie in Abb. 10 beschrieben präzipitiert und die relative Bindung quantifiziert. (A) HA-IP (PR). Bindung der TPR-Proteine relativ zum Mittelwert der

Bindung von CHIP, FKBP52, PP5 und TPR2 von drei Einzelexperimenten, zwei bei FKBP51 (+SEM). (B) FLAG-IP Bindung des PR an die präzipitierten TPR-Proteine aus drei Einzelexperimenten (+SEM). (C) IB Analyse von Zellextrakten (Lysat) zeigt PR mittels HA-IB sowie TPR-Protein-Expression mittels FLAG-IB.

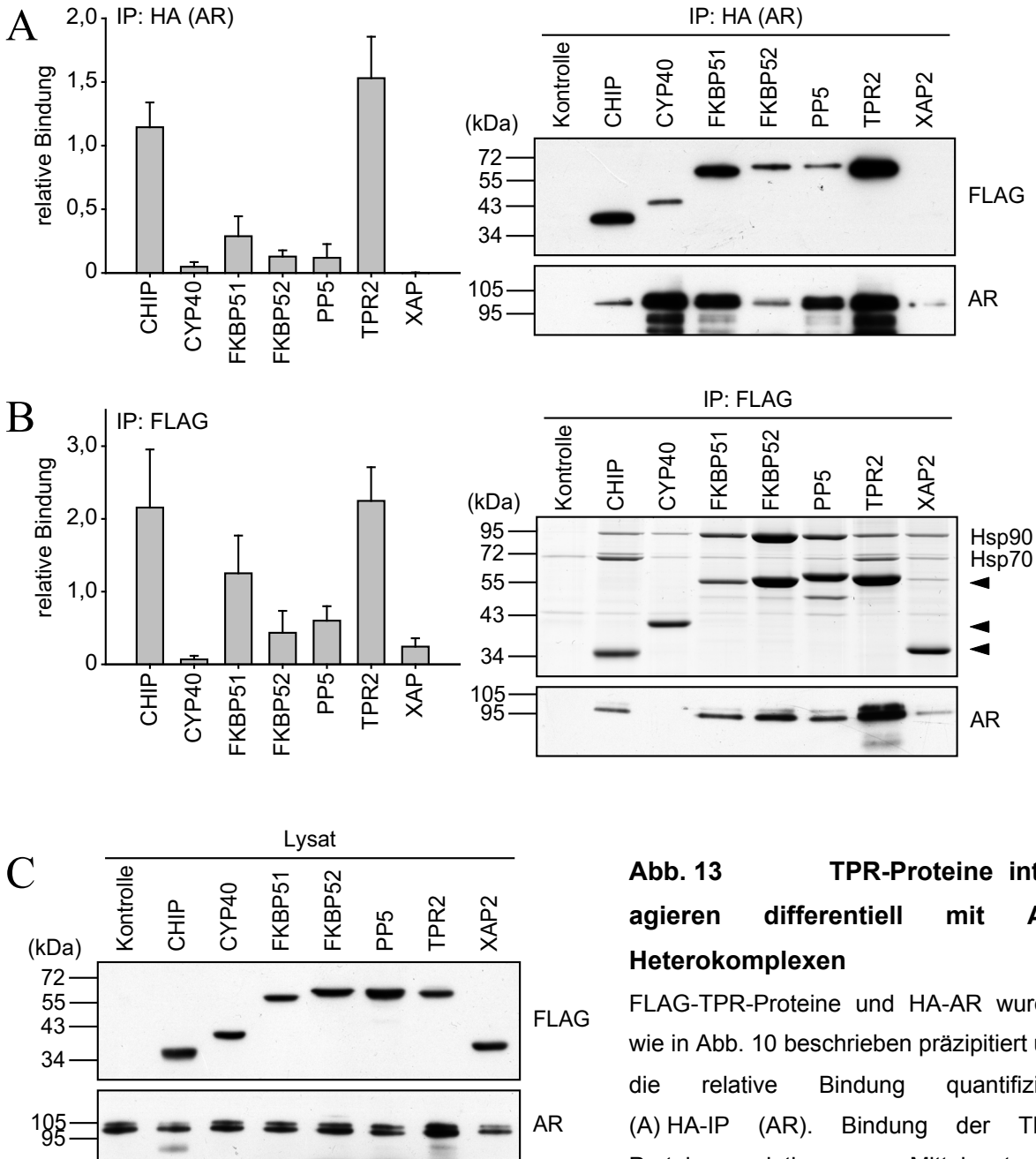


Abb. 13 TPR-Proteine interagieren differenziell mit AR-Heterokomplexen

FLAG-TPR-Proteine und HA-AR wurden wie in Abb. 10 beschrieben präzipitiert und die relative Bindung quantifiziert. (A) HA-IP (AR). Bindung der TPR-Proteine relativ zum Mittelwert der

Bindung von CHIP, FKBP51 und TPR2 von drei Einzelerperimenten, zwei bei XAP2 (+SEM). (B) FLAG-IP Bindung des AR an die präzipitierten TPR-Proteine aus drei Einzelerperimenten (+SEM). (C) IB Analyse von Zellextrakten (Lysat) zeigt AR mittels HA-IB sowie TPR-Protein-Expression mittels FLAG-IB.

4.1.7 TPR-Proteine rekrutieren differentiell Komponenten des Multichaperonheterokomplex

CHIP, FKBP51 und TPR2 wurden effizient in SR-Heterokomplexe inkorporiert und zeigten einen starken inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der SR. PP5 und XAP2 zeigten ebenfalls signifikante Effekte auf die SR-Aktivität, wurden jedoch im Vergleich zu den zuvor genannten TPR-Proteinen nur moderat in SR-Heterokomplexe eingebaut. Während der Reifung des SR durchläuft der Rezeptor einen Multichaperonkreislauf, in dem jeder Schritt durch die relative Abundanz bestimmter Chaperone bzw. Cochaperone charakterisiert wird (Pratt, 2003).

Um mehr Informationen über den potentiellen mechanistischen Einfluss der TPR-Proteine auf die Reifung der SR zu erhalten, wurde untersucht, welche endogenen Komponenten des Multichaperonkomplexes mit den verschiedenen TPR-Proteinen copräzipitieren. Der Vergleich der relativen Bindungen dieser Komponenten an die TPR-Proteine kann Unterschiede in dem Wirkmechanismus der verschiedenen TPR-Proteine auf die Rezeptoraktivität anzeigen. Für die Bestimmung der relativen Bindung von Hsp90 und Hsp70 wurden die Eluate der präzipitierten, an FLAG gekoppelten TPR-Proteine mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert (Abb. 14). Es wurde beobachtet, dass Hsp70 unspezifisch an die FLAG-Agarose bindet. Daher wurde, um die relative Bindung von Hsp70 an die TPR-Proteine zu bestimmen, die Intensität der Hsp70-Bande in der Kontrolle als Hintergrund definiert und der durch Densitometrie bestimmte Wert von dem experimentellen Wert subtrahiert. Für die relative p23-Bindung wurden die p23-Immunoblotsignale auf die Coomassiesignale der präzipitierten TPR-Proteine normalisiert. Die Coexpression der verschiedenen SR hatte keinen Einfluss auf die relative Copräzipitation von Hsp70, Hsp90 und p23. Daher wurden die Ergebnisse von Experimenten mit verschiedenen SR für die statistische Analyse der relativen Bindung dieser Komponenten an die TPR-Proteine zusammengefasst.

Die Analyse der Hsp70-Copräzipitation ergab, dass CHIP am stärksten mit Hsp70 interagiert, gefolgt von TPR2. Interessanterweise wurde in FKBP51-Präzipitaten eine relative Hsp70-Bindung identifiziert, die zwar deutlich unter der Bindung von CHIP oder TPR2 lag, trotzdem jedoch signifikant über der Hintergrundbindung (Abb. 14, B). Die Bindung von Hsp70 an PP5 überstieg nicht den Hintergrund genau wie bei den übrigen untersuchten TPR-Proteinen. Eine Hsp90-Bindung konnte bei allen hier analysierten TPR-Proteinen gezeigt werden. Der Vergleich der relativen Hsp90-Bindung der verschiedenen TPR-Proteine zeigte, dass FKBP51 und FKBP52 am effizientesten Hsp90 präzipitierten und

PP5 moderate Mengen von Hsp90. CHIP, Cyp40, TPR2 und XAP2 präzipitierten Hsp90 ähnlich effizient, im Vergleich zu FKBP51, FKBP52 und PP5 waren die Mengen jedoch gering.

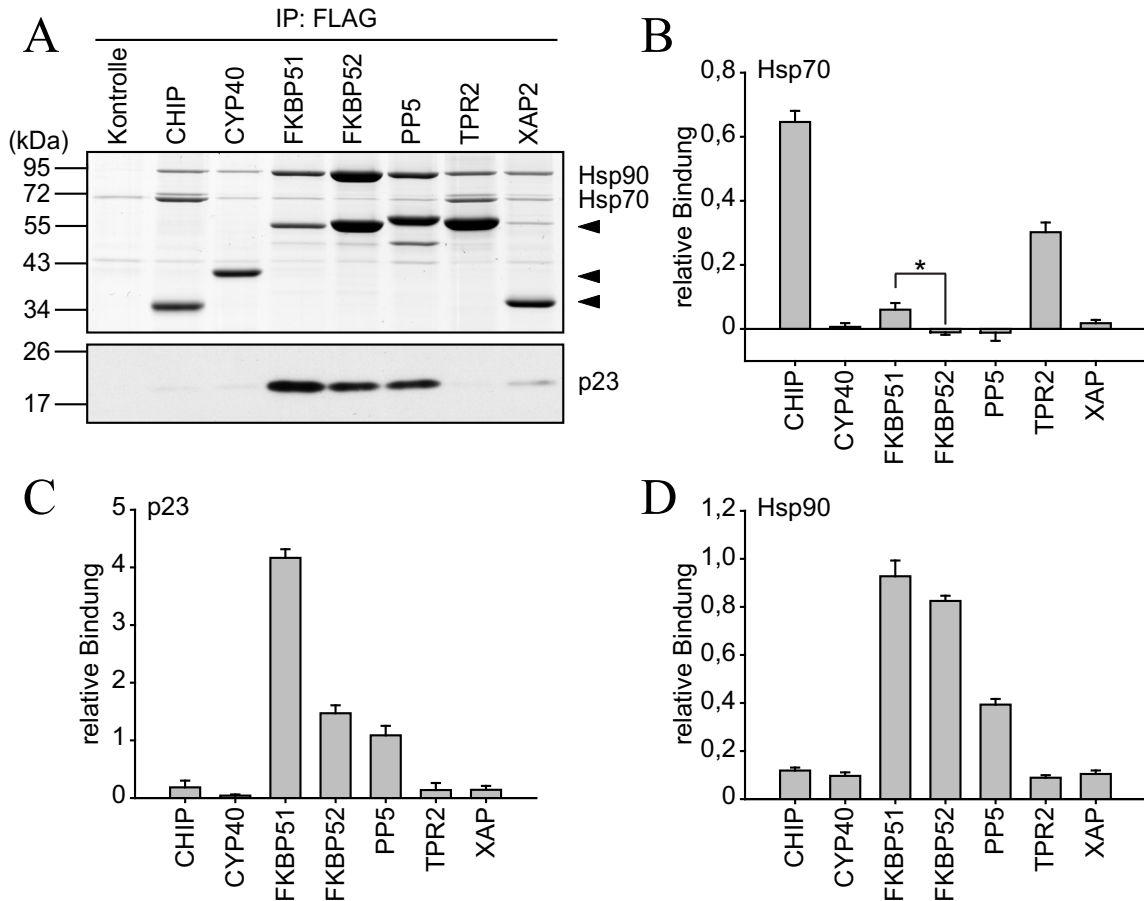


Abb. 14 Heterokomplexe der TPR-Proteine enthalten verschiedene Komponenten der Multichaperonmaschinerie

FLAG-TPR-Proteine wurden wie in Abb. 10 beschrieben präzipitiert und die relative Bindung quantifiziert. Die Coomassiebanden der präzipitierten TPR-Proteine, des copräzipitierten Hsp70 und Hsp90 (A, oben), sowie die p23-IB-Signale (A, unten) wurden mittels Densitometrie analysiert. (B+D) Quantifizierung der relativen Bindung des copräzipitierten Hsp70 (B) und Hsp90 (D). Hsp90 Signale und die für die Hintergrundbindung korrigierten Hsp70 Signale wurden auf die Signale der präzipitierten TPR-Proteine im coomassiegefärbten Gel normalisiert. Daten repräsentieren relative Bindung (+SEM) von mindestens 12 Einzelexperimenten mit unterschiedlichen SR. (C) Quantifizierung der relativen Bindung des copräzipitierten p23. Die p23-IB-Signale wurden auf die Signale der TPR-Proteine im Coomassie gefärbten Gel normalisiert und anschließend auf den Durchschnitt der normalisierten p23-Eluatsignale, aller TPR-Proteine. Daten repräsentieren den Mittelwert der relativen Bindung (+SEM) von 7 Experimenten mit verschiedenen SR.

Das Cochaperon p23 beeinflusst SR in einer späten Phase des Chaperonkreislaufes. Es bindet an Hsp90 und stabilisiert dessen ATP-gebundene Konformation (Freeman, 2000; Ali, 2006). Die Interaktion von p23 an die TPR-Proteine wird daher über Hsp90 vermittelt. Die Menge des copräzipitierten p23 kann somit die Affinität der TPR-Proteine für Hsp90 widerspiegeln. Bei den schwach mit Hsp90 interagierenden TPR-Proteinen CHIP, Cyp40, TPR2 und XAP2 konnte nur in vereinzelt Experimenten eine schwache Bindung von p23 identifiziert werden. FKBP51 interagiert am stärksten mit Hsp90 und zeigte auch die stärkste Interaktion mit p23. Interessanterweise wurde bei FKBP52, im Vergleich zu FKBP51, eine stark reduzierte p23 Bindung identifiziert, obwohl diese beiden TPR-Proteine Hsp90 in vergleichbaren Mengen präzipitierten. Die moderate Interaktion von PP5 mit Hsp90 spiegelte sich auch in der relativen Bindung von p23 wider, das im Vergleich zu den anderen TPR-Proteinen ebenfalls moderat von PP5 präzipitiert wurde.

Zusammenfassend zeigte die Analyse der Präzipitation von verschiedenen Komponenten des Hsp90/Hsp70-Multichaperonkomplexes durch die TPR-Proteine, dass jeder hier untersuchte Cofaktor ein spezifisches Bindungsprofil aufweist. Der Vergleich zu den Rezeptorpräzipitationen zeigte, dass die TPR-Proteine, die am stärksten mit Rezeptorkomplexen interagieren, entweder stark mit Hsp70 oder mit Hsp90 interagieren. Eine Ausnahme bildet FKBP52, das stark mit Hsp90 interagiert, jedoch nur moderat in Rezeptorkomplexe inkorporiert wurde.

4.1.8 TPR-Proteine beeinflussen die subzelluläre Verteilung des MR in Abwesenheit von Hormon

Im Vergleich zu den anderen SR zeigte der MR eine hohe basale Aktivität in steroidfreiem Medium. Interessanterweise wurde die transkriptionelle Aktivität des MR in Abwesenheit von Hormon genauso durch Überexpression der TPR-Proteine beeinflusst wie nach Stimulation mit subsaturierenden Fludrocortisolkonzentrationen (3 nM) (Abb. 4, Vgl. B+D). Es wird vermutet, dass TPR-Proteine die Translokation der Rezeptoren in den Nukleus regulieren (Czar, 1995; Owens-Grillo, 1996). So reduziert FKBP51 die nukleäre Translokation des GR, indem die Interaktion des GR-Heterokomplexes mit dem Motorprotein Dynein aufgehoben wird (Wochnik, 2005). Um zu untersuchen, ob die in steroidfreiem Medium beobachteten Effekte der TPR-Proteine auf die Transaktivierung des MR auch in einer subzellulären Umverteilung des MR resultieren, wurde die Lokalisation eines mit GFP (*engl.* Green fluorescent protein) fusionierten MR untersucht. Für diese Untersuchung wurden HeLa-Zellen verwendet, da diese eine Morphologie besitzen, die eine zweifelsfreie Unterscheidung zwischen Nukleus und Zytoplasma ermöglicht. Die Zellen wurden mit

gleichen Mengen eines GFP-MR exprimierenden Plasmids und einem der TPR-Proteine transfiziert und das GFP-Signal anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Für jede Bedingung wurden >100 Zellen in jedem Experiment durch unabhängige Observation hinsichtlich der Verteilung des Signals zwischen Nukleus und Zytoplasma bewertet und in verschiedene Gruppen eingeteilt. Für die Erstellung einer Durchschnittsbewertung der Translokation wurden den Gruppen Zahlwerte zugeteilt, die als Multiplikator für die Zellzahl einer jeweiligen Gruppe diente. So wurden Zellen mit einer überwiegend zytosolischen GFP Fluoreszenz mit „-1“ bewertet, „+0“ bei einer gleichmäßigen Verteilung zwischen Kern und Zytoplasma, „+0,5“ bei einer teilweisen nukleären Lokalisation, mit „+1“ bei überwiegender nukleären Lokalisation und mit „+2“, wenn die Fluoreszenz ausschließlich im Kern nachgewiesen werden konnte. In den hier durchgeführten Experimenten wurde beobachtet, dass der GFP-MR überwiegend im Nukleus lokalisiert (Abb. 15, A-C), wenn die Zellen in Medium kultiviert wurden, das mit 10% steroidfreiem (SF) FBS versetzt war. Dieses SF-FBS wurde mit Aktivkohle behandelt, um die normalerweise im Serum enthaltenden Steroide zu entfernen. Obwohl mittels HPLC bestätigt wurde, dass dieses FBS keine Steroidhormone enthält, die als MR-Liganden bekannt sind, besteht die Möglichkeit, dass im SF-FBS Bestandteile verbleiben, die eine transkriptionelle Aktivierung des MR bewirken.

Daher wurde untersucht, ob ein Bestandteil des SF-FBS die Aktivierung und Translokation des MR bewirkt. Hierzu wurden GFP-MR transfizierte Zellen 3 h vor der Fixierung für die Fluoreszenzanalyse in Medium ohne FBS kultiviert. Dieser Serumentzug führte zu einer Umverteilung des GFP-MR und zu einer reduzierten Kernfluoreszenz im Vergleich zu den Zellen, die in Medium kultiviert wurden das mit steroidfreiem FBS versetzt worden war (Abb. 15, B+C, Vgl. Kontrollen). Reporterassays zeigten darüber hinaus, dass Serumentzug durch Kultivierung der Zellen für 24 h in mit 0,1% SF-FBS versetztem Medium zu einer Abnahme der transkriptionellen Aktivität des MR führte, im Vergleich zu Zellen, die in steroidfreiem Medium (10% SF-FBS) kultiviert wurden (Abb. 15, D).

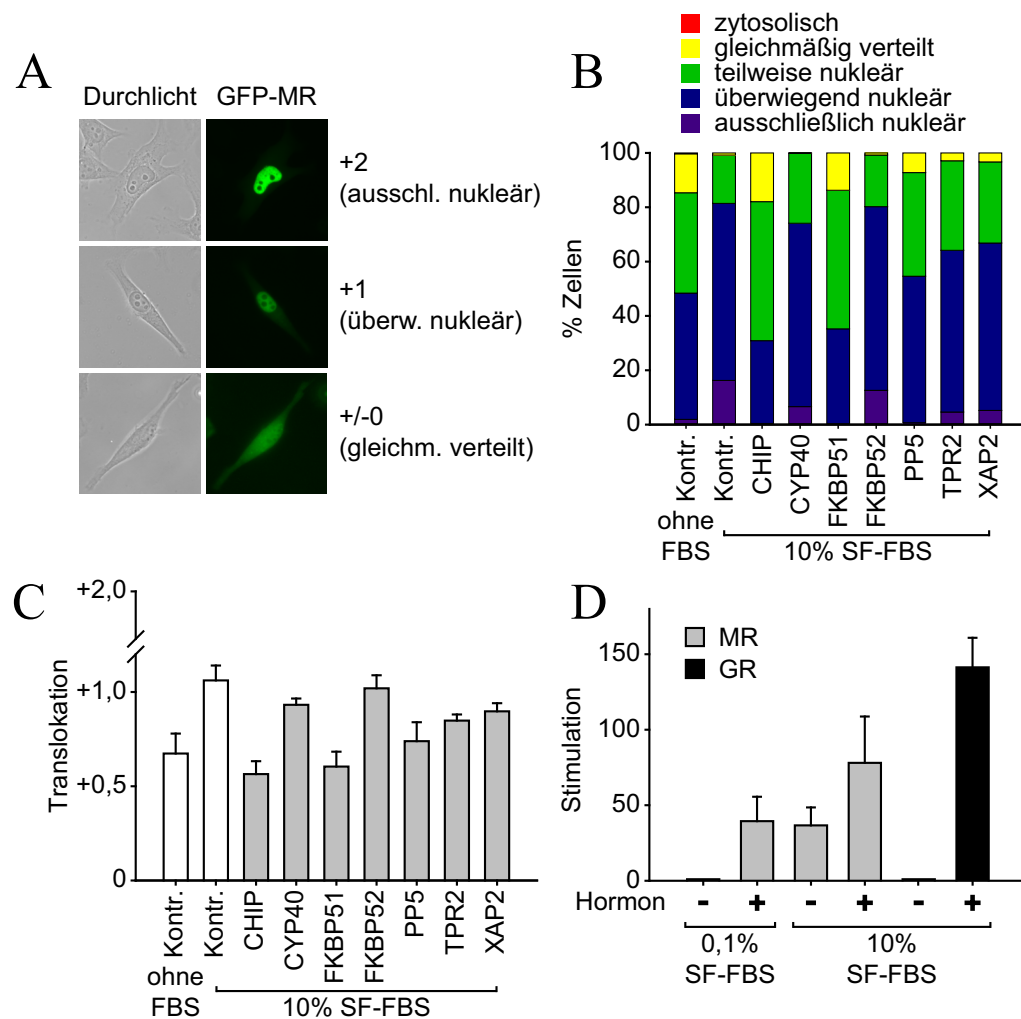


Abb. 15 TPR Cofaktoren verändern die Verteilung des GFP-MR in Abwesenheit von Hormon

(A-C) HeLa-Zellen wurden mit 0,25 μ g GFP-fusionierten MR und 1 μ g eines TPR Cofaktor exprimierenden Plasmids transfiziert. Die Zellen wurden 24 h in Medium kultiviert, das mit 10% steroidfreiem FBS (SF-FBS) versetzt war und für die fluoreszenzmikroskopische Analyse fixiert. In einer Kontrollreaktion wurden die Zellen vor dem Fixieren für 3 h in Medium ohne FBS kultiviert. Der subzellulären Lokalisation des GFP-MR von >100 Zellen wurde ein Wert zugeordnet („-1“ zytosolisch, „+0“ gleichmäßig verteilt, „+0,5“ teilweise nukleär, „+1“ überwiegend nukleär, „+2“ ausschließlich nukleär). (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen exemplarisch die subzelluläre Lokalisation des GFP-MR entsprechend dem Translokationswert. (B) Darstellung des prozentualen Anteils der Zellen mit einer entsprechenden subzellulären Lokalisation des MR. (C) Darstellung der Translokationsbewertung des MR aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten (+SEM). (D) **MR wird durch steroidfreies Medium aktiviert.** SK-N-MC-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid MMTV-Luc, dem Kontrollplasmid Gaussia-KDEL sowie mit Plasmiden, die einen HA gekoppelten MR oder GR exprimieren, transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen in Medium mit 0,1% oder 10% SF-FBS kultiviert und mit 0,03 nM Fludrocortisol (MR) oder 5 nM Cortisol (GR) für 24 h stimuliert.

Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass nichtglucocorticoide Liganden zu einer transkriptionellen Aktivierung und nukleären Translokation des MR führen können. Dieser Effekt war additiv zu dem durch Glucocorticoide vermittelten Effekt, da die Stimulation mit 0,03 nM Fludrocortisol in steroidfreiem Medium zu einer stärkeren Aktivierung des MR führte als in serumfreien (0,1% SF-FBS) Medium (Abb. 15, D).

Bei Kultivierung der Zellen in mit 10% SF-FBS versetztem Medium, führte die Coexpression einiger TPR-Proteine mit dem GFP-MR dazu, dass der GFP-MR im Vergleich zur Kontrolle eine veränderte subzelluläre Lokalisation zeigte. Die meisten Faktoren, die einen inhibitorischen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität des MR in Abwesenheit von Hormon aufwiesen, zeigten einen entsprechenden Effekt auf die nukleäre Translokation des MR (Vgl. Abb. 4, D und Abb. 15, B+C). Jedoch zeigte der Cofaktor TPR2, welcher ein starker Inhibitor der durch MR vermittelten Transaktivierung war, nur einen geringen Effekt auf die nukleäre Translokation. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass TPR2 bei Mechanismen während der Aktivierung des MR agiert, welche die Translokation des Rezeptors unter den untersuchten experimentellen Bedingungen nur wenig beeinflussten und die sich von den Mechanismen der anderen inhibierenden TPR-Proteine unterscheiden.

4.2 Molekulare Charakterisierung des durch Stress regulierten Gens TU3A

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Determinanten charakterisiert, welche die Wirksamkeit der Stresshormonrezeptoren und verwandter Rezeptoren bestimmen. In dem nun folgenden zweiten Teil wurden die Auswirkungen der Stresshormonrezeptoraktivierung an einem Beispiel untersucht. In einer kürzlich veröffentlichten Studie (Liebl, 2009) wurden Gene identifiziert, deren Expression nach Exposition auf einen starken Stressor verändert waren. Im Detail wurde maternale Separation bei 9 Tage alten Mäusen durchgeführt, was einen Stimulus darstellt, der eine starke Stressantwort mit der daraus resultierenden Corticosteronausschüttung zur Folge hat. Durch Microarrayexperimente wurde TU3A (DRR1, FAM107A) als ein Gen identifiziert, dessen Expression in Folge der Corticosteronausschüttung im PVN, der Amygdala und dem Cortex verstärkt war. Systematische, genomweite Expressionsanalysen in verschiedenen Geweben zeigten, dass das TU3A-Transkript am stärksten im zentralen Nervensystem, und hier besonders im präfrontalen Cortex, exprimiert ist (Su, 2004). Bisher veröffentlichte Studien zu TU3A zeigen keinen funktionellen Zusammenhang zwischen TU3A-Expression und Prozessen des zentralen Nervensystems. Jedoch wurde kürzlich eine Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von TU3A in *post mortem* Gewebe des dorsolateralen präfrontalen Cortex und Patienten, die an Schizophrenie oder Bipolarer Störung erkrankt waren, identifiziert (Shao, 2008). TU3A gilt als Tumorsuppressorgen, da es ursprünglich als Gen identifiziert wurde, das in vielen Nierenzellkarzinomen aufgrund chromosomaler Deletion nicht exprimiert ist (Yamato, 1999). Ausserdem zeigt eine Studie, dass nach Überexpression des *Xenopus L.* TU3A-Homologs die Zellviabilität in humanen A549-Zellen erniedrigt ist (Zhao, 2007). Über die molekulare Funktion des TU3A-Genprodukts ist bisher jedoch nichts bekannt.

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit soll die molekulare Funktion des TU3A-Proteins identifiziert werden.

4.2.1 Bioinformatische Analyse der TU3A-Aminosäuresequenz

Das TU3A-Gen codiert für ein kleines Protein mit einer Länge von 144 Aminosäuren und einem vorhergesagten Molekulargewicht von 17,5 kDa. Innerhalb des TU3A-Proteins befindet sich ein Bereich über 117 Aminosäuren, der homolog zu Sequenzabschnitten in anderen Proteinen ist und somit eine potentielle Proteindomäne darstellt (Abb. 16). Diese Domäne (DUF1151, Pfam06625) ist hoch konserviert und wurde bisher nur in potentiellen Proteinsequenzen der Eumetazoa (mehrzellige Tiere, die Keimblätter während der

Embryogenese bilden) identifiziert. Bioinformatische Analysen zur Strukturvorhersage des Proteins ergaben, dass sich innerhalb der potentiellen Domäne ein Cluster befindet, in dem helikale Strukturen und Schleifen alternierend aufeinander folgen (Abb. 16, unten). Dieses als *coiled coil* (engl.) bezeichnete Strukturmotiv vermittelt häufig physikalische Interaktionen zwischen Proteinen.

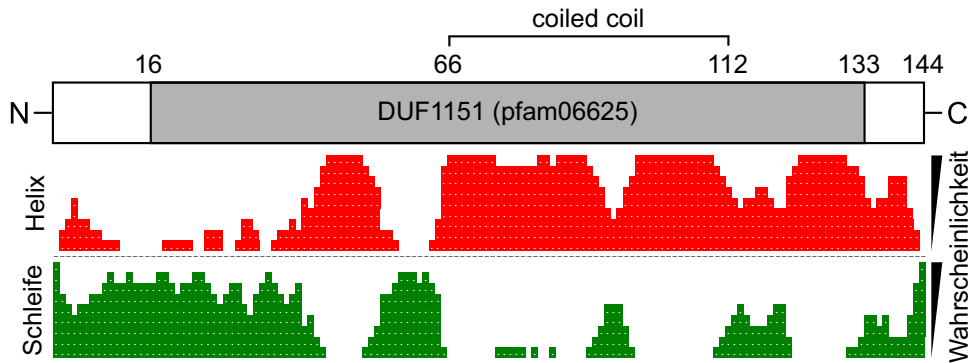


Abb. 16 Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Struktur motive von TU3A

Grau: potentielle Proteindomäne DUF1151 (pfam06625) von Aminosäure 16-133. Sekundärstrukturvorhersage durch den *Predict Protein* Server (Rost, 2004): Rot zeigt Wahrscheinlichkeit einer Helix, Grün die Wahrscheinlichkeit einer Schleife. Aminosäuren 66-112: Bereich des vom UniProt Server vorhergesagten (engl.) coiled coil Strukturmotivs.

4.2.2 Identifikation von TU3A-Interaktionspartnern

Funktionen von Proteinen liegen häufig in der Beeinflussung der Aktivität anderer Proteine. Diese funktionelle Interaktion bedingt meist auch eine physikalische Wechselwirkung. Für die Identifikation von Interaktionspartnern wurde die Methode der Coimmunopräzipitation verwendet. Hierzu wurde TU3A mit einem C-terminal fusionierten FLAG-Epitop in humanen HEK-293 Zellen überexprimiert und mittels einer FLAG-Agarose Säule präzipitiert. Die Analyse des Eluats mittels SDS-PAGE und nachfolgender Massenspektrometrie ergab, dass das 23 kDa große Peroxidredoxin 1 und das 40 kDa β -Aktin mit TU3A copräzipitieren (Abb. 17, links). Diese Interaktion wurde ebenso in COS7 Zellen identifiziert (Daten nicht gezeigt) und darüber hinaus mittels Immunoblotanalyse bestätigt (Abb. 17, rechts). Daneben wurde das 72 kDa große PRMT5 (Protein Arginine Methyl Transferase 5) innerhalb kontaminierender Spektra des unspezifisch an die Säule bindenden 70 kDa großen Hsp70 indentifiziert.

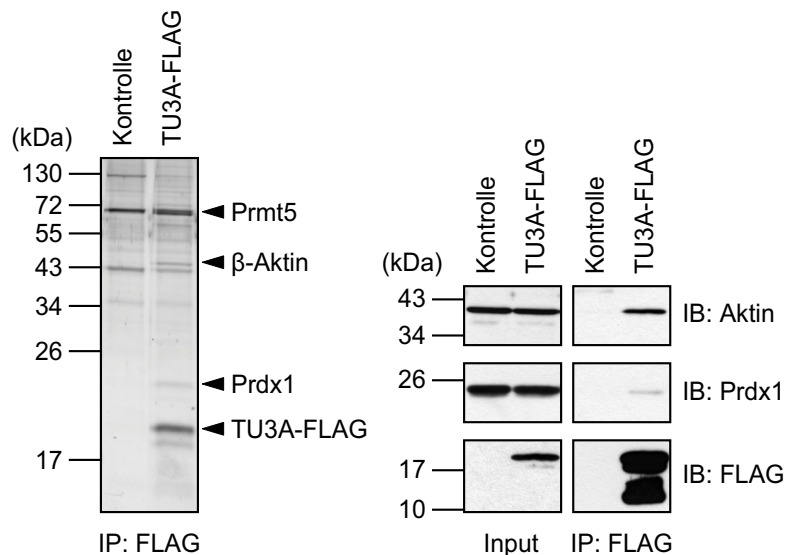


Abb. 17 TU3A interagiert mit Prdx1, β -Aktin und Prmt5

TU3A-FLAG wurde in HEK-293 Zellen überexprimiert und immunpräzipitiert. *Links*: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel der Eluate. Pfeilspitzen zeigen die Position des präzipitierten TU3A-FLAG sowie die copräzipitierten Proteine. *Rechts*: Immunoblotanalyse (IB) des Lysats (Input) und des Eluats (IP: FLAG).

4.2.3 GFP-TU3A colokalisiert mit F-Aktin

Funktionell in Wechselwirkung stehende Proteine sind häufig in zellulären Clustern organisiert. Somit kann die Identifikation der subzellulären Lokalisation eines Proteins erste Hinweise über dessen Funktion geben. Für die intrazelluläre Lokalisation von TU3A wurde dieses über den N-Terminus mit GFP (engl. *green fluorescent protein*) fusioniert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte nach Überexpression GFP-TU3A im Zellkern und im Zytoplasma in NIH-3T3-Zellen (Abb. 18, A). Eine ähnliche Lokalisation des GFP-TU3A wurde auch nach Überexpression in HeLa- und COS7-Zellen identifiziert (Abb. 19 und Daten nicht gezeigt). Eine Immunfärbung gegen endogen exprimiertes Prdx1 in GFP-TU3A überexprimierenden Zellen zeigte eine zytoplasmatische Prdx1-Lokalisation, die jedoch nicht mit den zytoplasmatischen GFP-TU3A-Strukturen colokalisierte (Abb. 18, A). Dagegen zeigte die Visualisierung von Aktinfilamenten mit Hilfe von fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin eine deutliche Lokalisation von GFP-TU3A in F-Aktin-reichen Strukturen wie Stressfasern oder Membranaufstülpungen (engl. *membrane ruffles*). Interessanterweise zeigte das F-Aktin-Zytoskelett in TU3A überexprimierenden Zellen zudem eine veränderte Struktur im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 18, B).

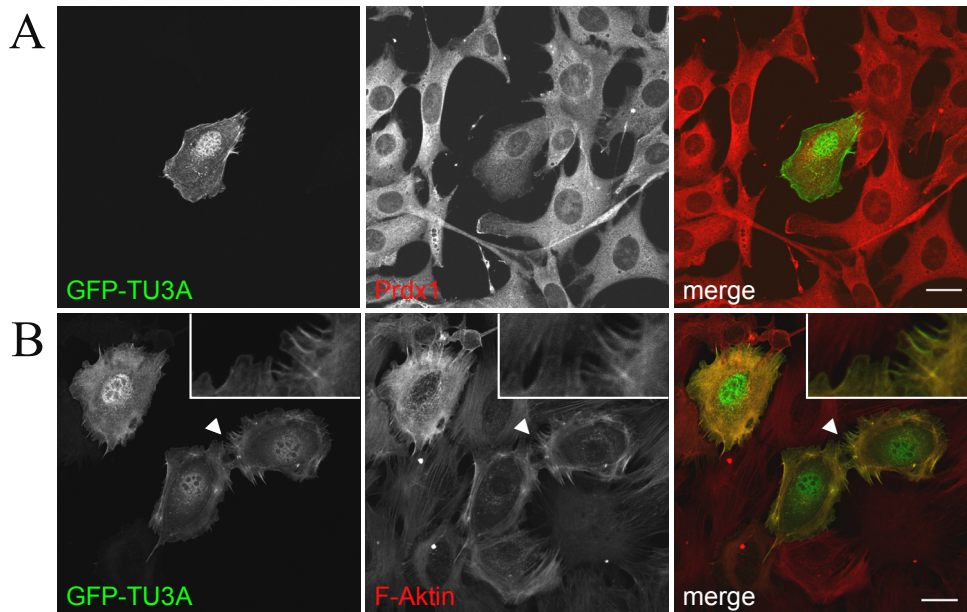


Abb. 18 Zytoplasmatisches TU3A colokalisiert mit F-Aktin, jedoch nicht mit Prdx1

NIH-3T3-Zellen wurden mit GFP-TU3A exprimierenden Plasmiden transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, gefärbt und mittels LSM analysiert. *Links*: GFP-Fluoreszenz zeigt TU3A-Lokalisation im Zellkern und im Zytoplasma. *Mitte*: Visualisierung von (A) Prdx1 mittels Immunfluoreszenz und (B) F-Aktin mittels fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin. *Rechts*: Überlagerung (merge) zeigt Lokalisation von TU3A (A+B, grün) und Prdx1 (A, rot) sowie Colokalisation von TU3A mit F-Aktin (B, rot) in Membranaufstülpungen und Stressfasern. Die Pfeilspitze deutet auf den vergrößerten Bereich. Abbildungen zeigen maximale Projektion von 4 Einzelbildern. Maßstab 25 μm .

4.2.4 Erstellung von polyklonalen TU3A-Antikörpern mittels rekombinantem TU3A

Für die Analyse von endogen exprimiertem TU3A wurden polyklonale Antikörper produziert. Hierzu wurde TU3A mit einer N-terminal fusionierten poly-Histidinsequenz und einer C-terminal fusionierten FLAG-Sequenz (HIS-TU3A-FLAG) mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und als Antigen für die Vaccinierung von Hasen verwendet. Die Konzentration und Reinheit des rekombinanten TU3A wurde durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 19, A). Die Produktion der polyklonalen Antikörper erfolgte bei der Firma Biogenes (Berlin). Biogenes führte die Vaccinierung, die IgG Aufreinigung aus dem Serum und die Affinitätsaufreinigung unter Verwendung des rekombinanten HIS-TU3A-FLAG durch. Eine Immunoblotanalyse ergab, dass der Antikörper in HEK-293 Zellen überexprimiertes TU3A und das rekombinante HIS-TU3A-FLAG spezifisch erkennt (Abb.

19, B). Daneben produzierte der Antikörper ein Signal in der Höhe, welche der berechneten Größe des endogenen TU3A entspricht. Dieses Signal ist in Cerebellumlysaten, aber nicht in Lysaten des Hirnstammes nachweisbar und entspricht somit den Ergebnissen der Expressionsunterschiede zwischen den Geweben, die mittels *in situ* Hybridisierung identifiziert wurden. Für die Analyse der Spezifität der polyklonalen Antikörper wurde GFP-TU3A in HeLa-Zellen überexprimiert und diese anschließend mit dem TU3A-Antikörper immungefärbt. Eine Überlagerung des GFP-Signals mit dem Signal des TU3A-Antikörpers zeigt die Signale, die durch eine spezifische Bindung des Antikörpers an native Epitope des ungetagten TU3A-Proteins binden. Das mit dem TU3A-Antikörper erzeugte Signal detektierte spezifisch native Epitope des TU3A, da nur GFP-TU3A überexprimierende Zellen ein Immunfluoreszenzsignal ergaben (Abb. 19, C). Interessanterweise überlagerte sich das GFP- und TU3A-Immunfluoreszenzsignal nur im Cytosol der Zellen. Eine reduzierte Erreichbarkeit der nukleären TU3A Epitope durch z.B. eine zu geringe Permeabilisierung der Zellen ist sehr unwahrscheinlich, da durch eine Doppelimmunfärbung mit einem GFP-Antikörper eine nahezu vollständige Deckungsgleichheit mit dem Signal der GFP-Fluoreszenz erreicht wurde (Abb. 19, C). Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass der TU3A-Antikörper das endogen exprimierte TU3A spezifisch erkennt.

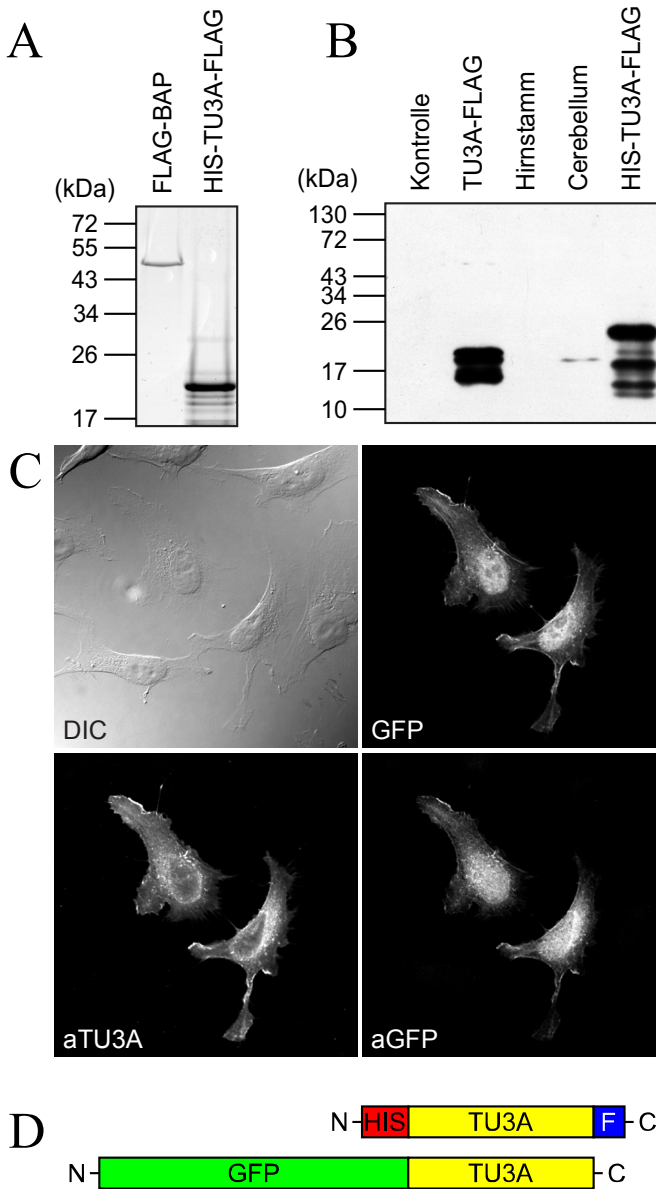


Abb. 19 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen TU3A

HIS-TU3A-FLAG wurde in *E.coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. (A) Mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel zeigt Reinheit und Konzentration des HIS-TU3A-FLAG durch Vergleich der Bandenintensität von HIS-TU3A-FLAG (3 µl) mit rekombinatem FLAG-BAP (600 ng). (B) Immunoblot mit affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpern gegen TU3A. Kontrolle, TU3A-FLAG: Lysate von mit Kontrollplasmid oder TU3A-FLAG Plasmid transfizierten HEK-293-Zellen. Hirnstamm, Cerebellum: Lysate aus murinem Gewebe. HIS-TU3A-FLAG: rekombinantes, aufgereinigtes TU3A wie in (A). TU3A-FLAG (18,6 kDa), endogenes TU3A (17,5 kDa), HIS-TU3A-FLAG (22,7 kDa). (C) HeLa-Zellen wurden mit GFP-TU3A exprimierenden Plasmiden transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, gefärbt und mittels LSM analysiert. DIC: Differentialinterferenzkontrastbild. GFP: Fluoreszenz des GFP-TU3A-Fusionsproteins, aTU3A: Immunfluoreszenz mit TU3A-Antikörpern, aGFP: Immunfluoreszenz mit GFP-Antikörpern.

(D) Schematische Darstellung der TU3A-Fusionsproteine HIS-TU3A-FLAG (oben) als Antigen und GFP-TU3A (unten) als Kontrolle für die Antikörperspezifität.

4.2.5 TU3A-Proteinlevel werden durch Dexamethason reguliert

Experimente von Claudia Liebl (AG Marianne Müller, MPI für Psychiatrie) zeigten eine basale Expression der TU3A-mRNA in der hippocampalen CA3-Region, im Septum sowie im Cortex, wobei die stärkste Expression im Cerebellum beobachtet wurde. Physiologischer Stress, sowie Injektion von Dexamethason (Dex), erhöhte die TU3A-mRNA-Level im PVN, der Amygdala und dem Cortex signifikant. Um zu untersuchen, ob diese mRNA-Regulation auch zu einem Anstieg der TU3A-Proteinlevel führt, wurden Immunoblotanalysen an Extrakten der entsprechenden Hirnregion durchgeführt (Abb. 20). Die

Behandlung der Mäuse, die Präparation der Hirnregionen sowie die Erstellung der Proteinextrakte wurden von Claudia Liebl durchgeführt. Die Immunoblotanalysen zeigten, dass sich die Proteinlevel im Hippocampus und in der Hypophyse signifikant nach Behandlung mit Dex erhöhen, wobei im Cerebellum nur ein leichter Anstieg der Proteinlevel beobachtet wurde.

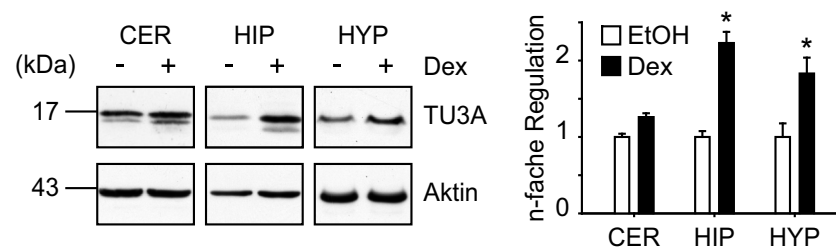


Abb. 20 TU3A-Proteinlevel werden durch Dexamethason reguliert

C57/BL16N Mäuse wurden mit Dex oder Vehikel als Kontrolle behandelt und der Hippocampus (HIP), die Hypophyse (HYP) und das Cerebellum (CER) präpariert. *Links*: Repräsentativer Immunoblot der Gehirnllysate aus dem CER, dem HIP und der HYP zeigt die erhöhten TU3A-Proteinlevel nach Dex Behandlung. *Rechts*: Densitometrische Analyse der auf das Aktinsignal normalisierten TU3A-Proteinlevel zeigt einen signifikanten Anstieg der TU3A-Expression im HIP ($p=0,024$) und in der HYP ($p=0,008$), jedoch nicht im CER ($p=0,208$). Dargestellt ist der Mittelwert der n-fachen Regulation (+SEM) von 9 behandelten Tieren zu 9 Kontrolltieren.

4.2.6 TU3A ist entlang von Axonen und Dendriten lokalisiert

Die TU3A-Expression ist in Geweben des ZNS am stärksten (Su, 2004). Um die Lokalisation des endogenen TU3A-Proteins in Neuronen zu analysieren, wurden primäre Neuronen aus dem Cerebellum für 5 Tage kultiviert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Immunfluoreszenz des endogen exprimierten TU3A zeigte ein punktartiges, in Clustern akkumuliertes Vorkommen (Abb. 21, A+B, *rechts*). Eine Cofärbung gegen den für Axon spezifischen Marker NFH (Neurofilament H) und gegen MAP2 (engl. *microtubule associated protein 2*), welches spezifisch Dendriten markiert, zeigte, dass die TU3A-Cluster auf Axonen und Dendriten lokalisieren (Abb. 21, B, *links+mitte*).

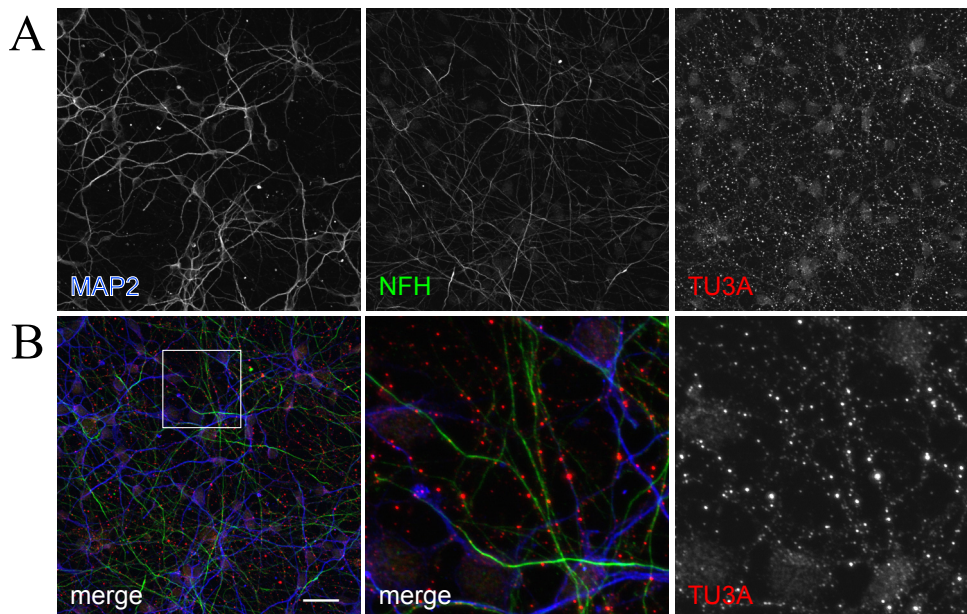


Abb. 21 TU3A-Lokalisation in primären Neuronen aus dem Cerebellum

Primäre murine Cerebellumneuronen wurden 5 Tage kultiviert, anschließend fixiert, gefärbt und mittels LSM analysiert. (A) *Links*: Visualisierung von Dendriten durch MAP2-Immunfluoreszenz. *Mitte*: Visualisierung von Axonen durch NFH-Immunfluoreszenz. *Rechts*: TU3A-Immunfluoreszenz. (B) *Links+Mitte*: Überlagerung (merge) der Immunfluoreszenz aus (A) zeigt Lokalisation von TU3A (Rot) auf Dendriten (MAP2, Blau) und Axonen (NFH, Grün). *Mitte+Rechts*: Vergrößerungen des im linken Bild markierten Ausschnitts. Abbildungen zeigen maximale Projektion von 4 Einzelbildern. Maßstab 25 μm .

4.2.7 TU3A colokalisiert mit Aktin in Neuronen

Die Visualisierung von Aktinfilamenten in den primären Kulturen von Neuronen aus dem Cerebellum mittels fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin zeigte, dass auch das endogen exprimierte TU3A mit F-Aktin colokalisiert (Abb. 22). Vergrößerte Aufnahmen der F-Aktin-Färbung lassen erkennen, dass in den analysierten primären Kulturen F-Aktin neben einer gleichmäßigen Verteilung entlang der Neuriten und des Zellsomas auch in Clustern akkumuliert (Abb. 22, *links*, Pfeile und Pfeilspitzen). Der Vergleich der Lokalisation zwischen den F-Aktin reichen Clustern mit den TU3A-Akkumulationen zeigte eine Überlappung beider Signale in einigen dieser Cluster (Abb. 22, *rechts* Pfeilspitzen). Interessanterweise zeigte sich, dass zwar in allen TU3A-Clustern auch ein F-Aktin-Signal detektierbar war, jedoch in einigen F-Aktin-Akkumulationen die TU3A-Expression stark reduziert war (Abb. 22, Pfeile). Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass TU3A *in vivo* mit F-Aktin assoziiert, wobei eine stabile Assoziation nicht essentiell für die Bildung von F-Aktin-Komplexen in Neuronen ist.

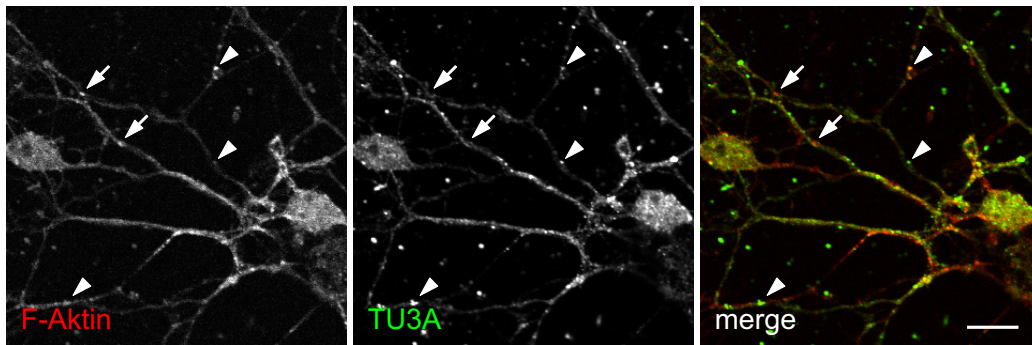


Abb. 22 TU3A colokalisiert mit Aktin in primären Cerebellumneuronen

Primäre murine Cerebellumneuronen wurden 5 Tage kultiviert, anschließend fixiert, gefärbt und mittels LSM analysiert. *Links*: Visualisierung von F-Aktin durch mit Fluoreszenz markierten Phalloidin. *Mitte*: Visualisierung von TU3A mittels Immunfluoreszenz. Überlagerung (merge) zeigt Colokalisation von endogen exprimiertem TU3A (grün) mit F-Aktin (rot). Pfeilspitzen deuten auf F-Aktin-Cluster, die positiv für TU3A färben, Pfeile deuten auf TU3A-negative F-Aktin-Cluster. Maßstab 10µm.

4.2.8 TU3A beeinflusst das Polymerisationsgleichgewicht von Aktin

Es wurde gezeigt, dass TU3A mit Aktin interagiert und in der Zelle colokalisiert. Nach Überexpression von TU3A zeigte das Zytoskelett von NIH-3T3-Zellen eine veränderte Struktur. Diese Beobachtung führte zu der Fragestellung, ob TU3A in funktioneller Wechselwirkung mit Aktin steht und die Polymerisierung von Aktin in die filamentöse Form beeinflussen kann. Hierfür wurde TU3A-FLAG, welches N-terminal an das Maltose bindende Protein (MBP) fusioniert war, mittels Tandemaffinitätschromatographie unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Für die nachfolgenden *in vitro* Experimente wurde das 61,3 kDa große MBP-TU3A-FLAG Fusionsprotein verwendet (Abb. 23, A), da sich herausstellte, dass das TU3A-FLAG nach proteolytischer Abspaltung des MBP unter den getesteten Bedingungen nicht stabil war (Daten nicht gezeigt).

Es konnte gezeigt werden, dass immunpräzipitiertes TU3A, welches in HEK-293 Zellen überexprimiert wurde, Aktin copräzipitierte (Abb. 17). Um zu untersuchen, ob das in Bakterien exprimierte rekombinante TU3A ebenso Aktin copräzipitiert, wurde MBP-TU3A-FLAG oder rekombinantes FLAG-BAP (BAP, bakterielle alkalische Phosphatase) mit untransfiziertem Lysat von HEK-293-Zellen inkubiert und anschließend copräzipitiert. Es zeigte sich, dass MBP-TU3A-FLAG, nicht aber FLAG-BAP, Aktin copräzipitierte (Abb. 23, B). Interessanterweise konnte Prdx1, welches mit dem in HEK-293-Zellen ektopisch exprimierten TU3A interagiert, nicht im Eluat von immunpräzipitiertem MBP-TU3A-FLAG nachgewiesen werden (Abb. 23, B).

Für die Fragestellung, ob TU3A mit der filamentösen Form von Aktin interagiert, wurde zunächst aufgereinigtes β -Aktin aus humanen Blutplättchen *in vitro* polymerisiert und anschließend mit MBP-TU3A-FLAG inkubiert. F-Aktin kann von G-Aktin durch Zentrifugation bei 150,000 g getrennt werden, wobei mit F-Aktin interagierende Proteine im Pellet angereichert werden. Es zeigte sich, dass TU3A mit dem *in vitro* polymerisierten F-Aktin interagiert, da es mit F-Aktin copelletierte (Abb. 23, C).

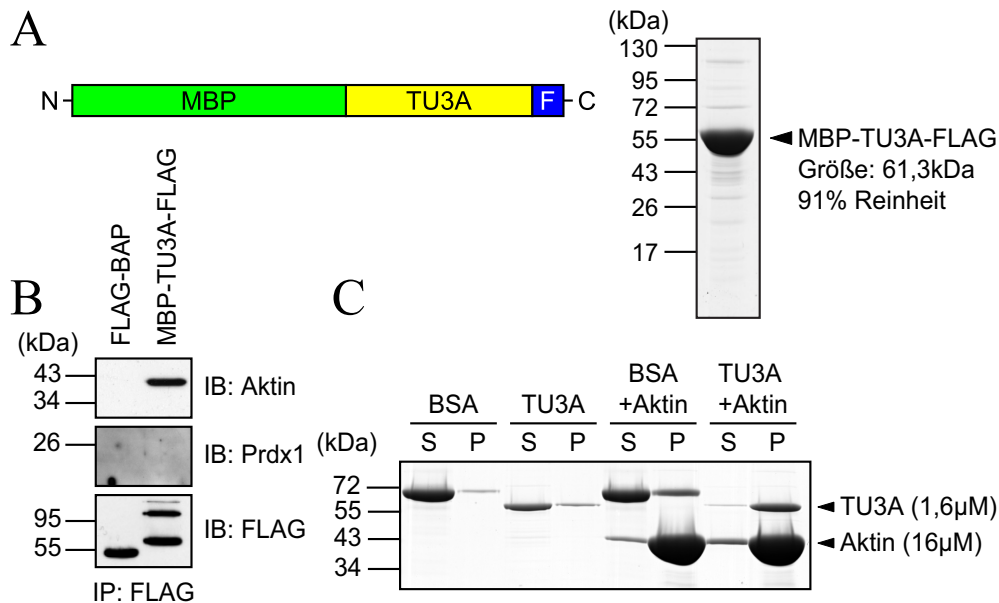


Abb. 23 Rekombinantes MBP-TU3A-FLAG interagiert mit F-Aktin

MBP-TU3A-FLAG wurde in *E.coli* exprimiert und mittels Tandem-Affinitätschromatographie aufgereinigt. (A) Links: Schematische Darstellung des MBP-TU3A-FLAG. Rechts: Mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE-Gel zeigt Reinheit des rekombinanten MBP-TU3A-FLAG. (B) MBP-TU3A-FLAG oder FLAG-BAP als Kontrolle wurde mit Lysat aus HEK-293 Zellen inkubiert und anschließend immunpräzipitiert. Immunoblotanalyse der Eluate (IP: FLAG) zeigt Copräzipitation von Aktin, jedoch nicht von Prdx1. (C) Copelletierung von MBP-TU3A-FLAG mit F-Aktin. MBP-TU3A-FLAG oder FLAG-BAP als Kontrolle wurde mit *in vitro* polymerisiertem Aktin inkubiert und anschließend zentrifugiert (150,000 g, 1,5 h, bei RT), um F-Aktin in der Pelletfraktion (P) von G-Aktin im Überstand (S) zu trennen. Mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel zeigt Analyse des Überstandes (S) und des Pellets (P) nach Zentrifugation.

Weiter wurde untersucht, ob TU3A das Polymerisationsgleichgewicht von Aktin beeinflusst, wenn Aktin in Anwesenheit von MBP-TU3A-FLAG polymerisiert. Hierbei mussten die Polymerisationsbedingungen so gewählt werden, dass die in der Reaktion eingesetzten Aktin-Monomere nicht vollständig polymerisieren. 4 μ M Aktin wurde durch

Zugabe von 3x FAB (F-Aktin Puffer) für 1h bei 25°C in Anwesenheit von MBP-TU3A-FLAG polymerisiert und nach Zentrifugation wurde das Verhältnis von G-Aktin im Überstand (S) zu F-Aktin im Pellet (P) mittels SDS-PAGE und Densitometrie der Aktinbanden bestimmt. Im Vergleich zur Polymerisation von 16 μM Aktin mit 10x FAB hat sich das Verhältnis von F- zu G-Aktin reduziert. Obwohl in einigen Experimenten ein Trend beobachtet wurde, dass TU3A das Aktinpolymerisationsgleichgewicht in Richtung F-Aktin verschiebt, war dieser Effekt im Zentrifugationsassay nicht über mehrere Experimente signifikant (Abb. 24 A+B).

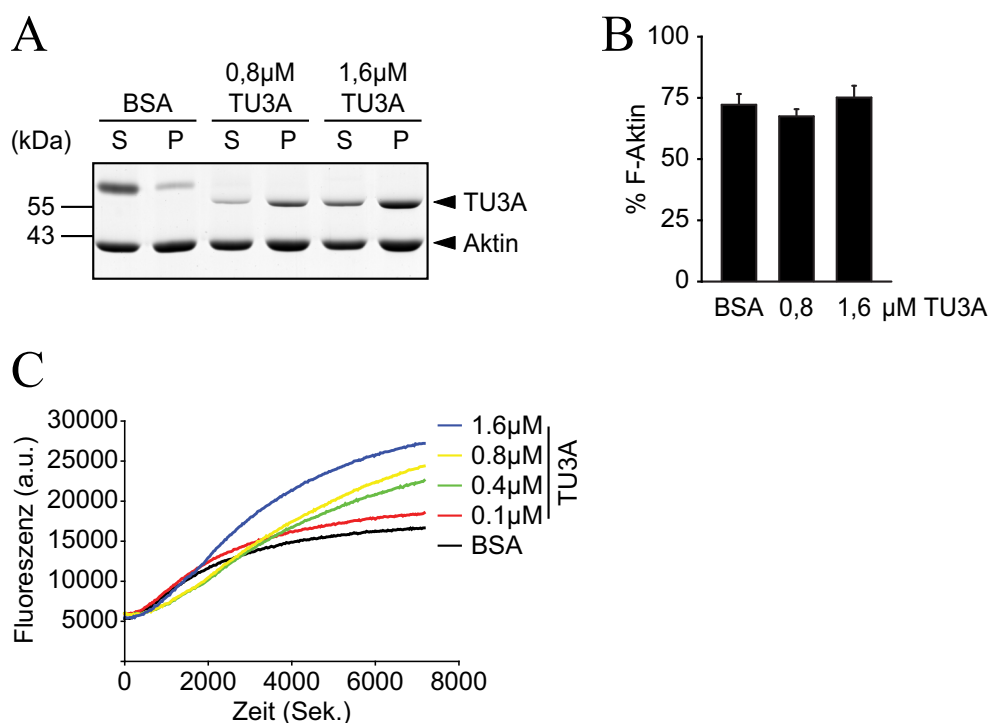


Abb. 24 TU3A beeinflusst das Aktinpolymerisationsgleichgewicht *in vitro*

(A+B) 4 μM Aktin wurde in Anwesenheit von TU3A oder BSA als Kontrolle *in vitro* polymerisiert. Die Reaktionen wurden zentrifugiert, um F-Aktin in der Pellet-Fraktion (P) von G-Aktin im Überstand (S) zu trennen. (A) Mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE-Gel zur Analyse des Überstandes (S) und des Pellets (P) nach Zentrifugation. (B) Densitometrische Quantifizierung des prozentualen Anteils von F-Aktin im Pellet an der gesamten Menge von Aktin im Pellet und Überstand (+SEM aus drei unabhängigen Experimenten) zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Menge an F-Aktin nach Inkubation mit TU3A. (C) Die Polymerisation von 8 μM mit Pyren markiertem Aktin (10% Pyren- α -Aktin, 90% β -Aktin), in Anwesenheit von MBP-TU3A-FLAG (TU3A) oder BSA als Kontrolle wurde durch Zugabe von 3x FAB induziert und in einem Fluoreszenzspektrometer verfolgt. Gezeigt ist der Verlauf der Fluoreszenz (*engl.* a.u.: willkürliche Einheiten) über die Zeit während der Aktinpolymerisation in einem repräsentativen Experiment.

Um den Effekt von TU3A auf die Aktinpolymerisation detaillierter zu untersuchen, wurde die Kinetik der Aktinfilamentbildung beobachtet. Hierzu wurde Aktin verwendet das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pyren markiert war, da es die Eigenschaft hat, als Filament stärker zu fluoreszieren als in monomerischer Form. Da nur muskuläres α -Aktin bisher stabil mit Pyren markiert werden konnte, wurde für die Messung der Polymerisationskinetik ein Aktinmisch aus 10% Pyren- α -Aktin und 90% β -Aktin verwendet, so dass die Kinetik durch die Polymerisation des β -Aktin determiniert wurde. Nach Induktion der Polymerisation von 8 μM Aktin durch Zugabe von 3x FAB folgte die Filamentbildung dem erwarteten sigmoidalen Verlauf. Nach einem langsamen Anstieg der Fluoreszenz während der *Lag*-Phase beschleunigte sich die Zunahme der Fluoreszenz bis diese in der stationären Phase ein Plateau erreicht hatte, in der die Rate der Polymerisation und Depolymerisation ausgeglichen ist (Abb. 24, C, BSA). In Anwesenheit von TU3A zeigte die Kinetik der Aktinpolymerisation einen veränderten Verlauf. Interessanterweise verlängerte sich die *Lag*-Phase zunächst, bis dann die Fluoreszenz schnell anstieg und die Fluoreszenz in der Kontrollreaktion (BSA) übertraf (Abb. 24, C). Der Effekt auf die Reduktion der Polymerisationsinitiation zeigte sich am deutlichsten bei TU3A-Konzentrationen von 0,8 und 0,4 μM . Betrachtet man den Verlauf der Reaktion, so erkennt man, dass die Fluoreszenz am Ende der Reaktion in Anwesenheit von 1,6 μM TU3A am stärksten war. Der Anstieg der Fluoreszenz zum Ende der Reaktion war jedoch in Anwesenheit von 0,8 μM TU3A am deutlichsten.

Das Polymerisationsgleichgewicht von Aktin wird durch die Hin- (Polymerisation) und Rückreaktion (Depolymerisation) bestimmt. Somit kann eine Verschiebung des Gleichgewichts zu F-Aktin durch eine Stabilisierung der Aktinfilamente vermittelt werden, da dies zu einer Reduzierung der Depolymerisationsgeschwindigkeit führt. Um zu untersuchen, ob TU3A Aktinfilamente stabilisieren kann, wurde die Depolymerisation von Aktinfilamenten durch Verdünnen induziert. Durch Verdünnen von F-Aktin in GAB (*engl.* G-Aktin buffer) Puffer wurde, neben der Aktinkonzentration, die Konzentration von Mg^{2+} und K^+ Ionen reduziert. Hierdurch wird die kritische Konzentration des Aktins erhöht, welche die niedrigste Konzentration darstellt, bei der G-Aktin-Monomere mit den Aktinfilamenten im Gleichgewicht vorliegen. In dieser Folge kommt es zu einer Verschiebung des Polymerisationsgleichgewichtes in Richtung G-Aktin. Die Anwesenheit von TU3A während der durch Verdünnung induzierten Depolymerisation führte zu mehr F-Aktin im Vergleich zur BSA-Kontrolle und somit zu einer Stabilisierung der Aktinfilamente (Abb. 25).

Zusammenfassend zeigte sich, dass TU3A an Aktinfilamente bindet und diese stabilisiert, so dass das Aktungleichgewicht verschoben wird und mehr Filamente gebildet werden.

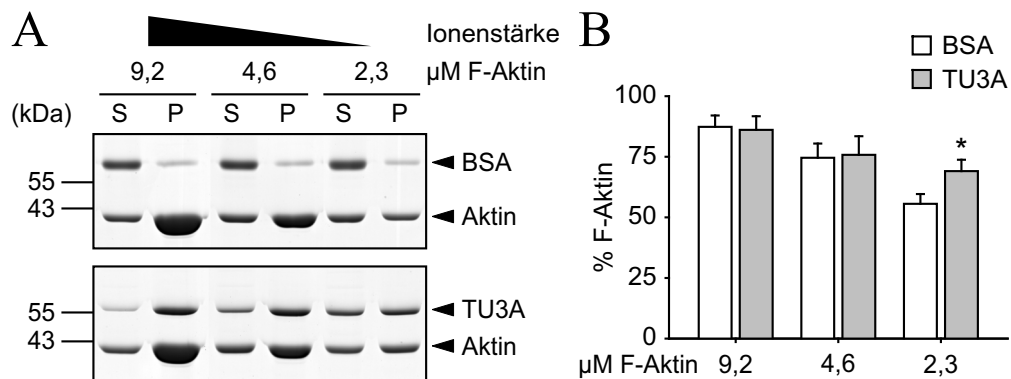


Abb. 25 TU3A stabilisiert Aktin *in vitro* nach durch Verdünnung induzierter Depolymerisation

Depolymerisation von *in vitro* polymerisiertem Aktin wurde durch Verdünnen in GAB induziert. Die Depolymerisation wurde durch Inkubation bei RT für 1 h in Anwesenheit von MBP-TU3A-FLAG (TU3A) oder BSA als Kontrolle durchgeführt und F- und G-Aktin anschließend durch Zentrifugation wie in Abb. 23 getrennt. (A) Mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE-Gel zeigt Analyse des Überstandes (S) und des Pellets (P) nach Zentrifugation. (B) Densitometrische Quantifizierung des prozentualen Anteils von F-Aktin im Pellet an der gesamten Menge von Aktin in Pellet und Überstand (+SEM aus drei unabhängigen Experimenten) zeigt einen Anstieg der Menge an F-Aktin nach Inkubation mit TU3A. ($p=0,009$ bei $2,3\mu\text{M}$ Aktin, in einem geparteten *T-Test*).

4.2.9 TU3A bündelt Aktinfilamente

Um den molekularen Mechanismus zu analysieren, nach denen TU3A-Aktinfilamente stabilisiert, wurden die *in vitro* polymerisierten Aktinfilamente visualisiert. Hierzu wurden mit $8\mu\text{M}$ Aktin gebildete Filamente mit der gleichen Menge an fluoreszenzmarkiertem Phalloidin fixiert und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In der BSA-Kontrolle wurden zwei Typen von unverzweigten Aktinfilamenten beobachtet. Der Grossteil der Filamente war dünn und kurz, mit einer durchschnittlichen Länge von etwa $7\mu\text{m}$ (Abb. 26, obere Reihe, Einsatz). Daneben wurden dickere Filamente bis zu einer Länge von $60\mu\text{m}$ und einem Durchmesser von bis zu $1\mu\text{m}$ beobachtet (Abb. 26, obere Reihe). Aktinfilamente, die in Gegenwart von $1,6\mu\text{M}$ TU3A polymerisiert wurden, zeigten eine veränderte Struktur. Die Anzahl von kurzen, dünnen Filamenten war stark reduziert (Abb. 26, untere Reihe, Einsatz). Interessanterweise wurden dafür Aktinfilamente beobachtet, die kurz, dick und ineinander

verwunden waren. Diese Struktur ähnelt der von Aktinfilamenten, die in Gegenwart der C-terminalen Domäne des Aktin *bundling* Faktors SSH1 gebildet werden (Kurita, 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass TU3A Aktinfilamente bündelt.

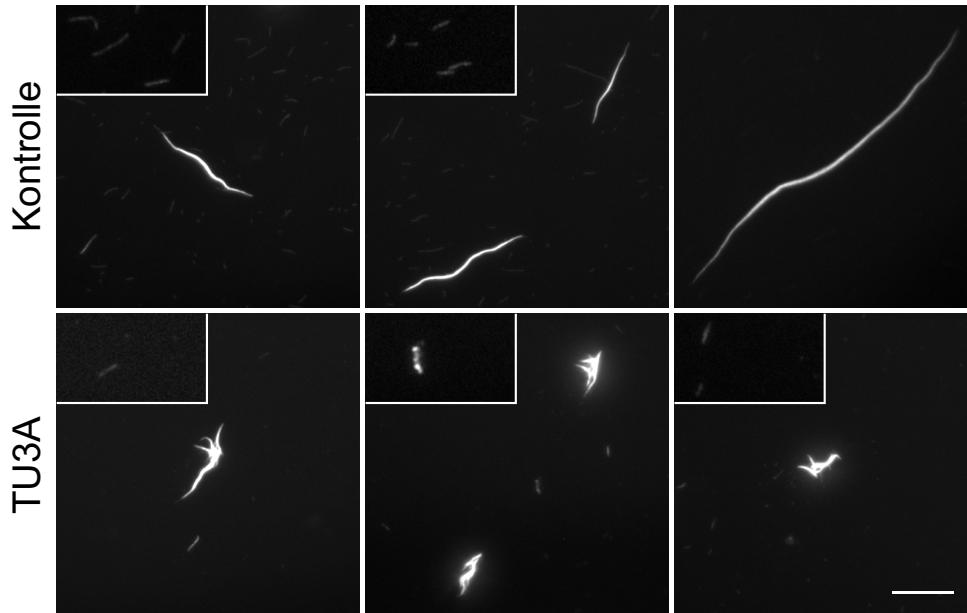


Abb. 26 TU3A bündelt Aktinfilamente

8 μM Aktin wurden in Anwesenheit von 1,6 μM MBP-TU3A-FLAG (TU3A) oder BSA als Kontrolle durch Zugabe von 3x FAB *in vitro* polymerisiert. Anschließend wurden die Filamente mit 8 μM Fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin gefärbt und für die Visualisierung auf eine Konzentration von 10 nM (bezogen auf das eingesetzte G-Aktin) in Fluoreszenzpuffer verdünnt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die eingesetzten Rechtecke zeigen jeweils einen (zweifach) vergrößerten und digital aufgehellten Bereich neben den großen Filamenten, um die kleinen und dünnen Filamente zu verdeutlichen. Maßstab: 10 μm .

4.2.10 TU3A-Überexpression beeinflusst die Neuritenentwicklung

Der Aufbau von Aktinfilamenten und deren dynamischer Umbau ist für viele zelluläre Vorgänge von elementarer Bedeutung. So ist z.B. die Entwicklung von Neuriten ein zentraler neuronaler Prozess, der die dynamische Reorganisation von Aktinfilamenten voraussetzt. Um einen Einfluss von TU3A auf einen von Aktin abhängigen neuronalen Prozess zu untersuchen, wurde die murine Neuroblastoma Zelllinie Neuro2a (N2A) als Modell verwendet. Diese Zelllinie entwickelt nach Entzug von Serum neuritenartige Strukturen, die sensitiv auf Veränderungen in der Aktindynamik reagieren (Wyle and Chantler, 2003). Nach Überexpression von GFP-TU3A wurden keine Veränderungen in der Morphologie der N2A-Zellen beobachtet, wenn diese in Medium mit 10% FBS kultiviert wurden (Abb. 27, A).

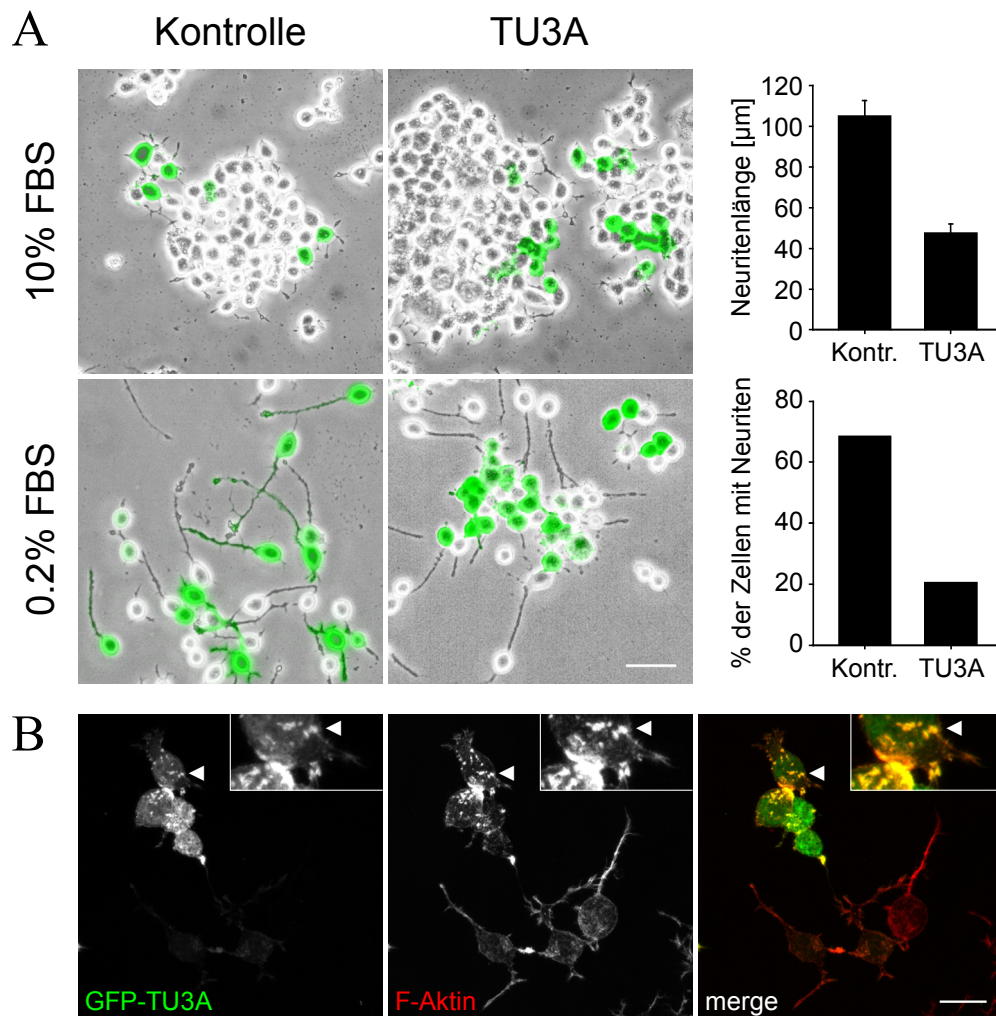


Abb. 27 TU3A-Überexpression beeinflusst die Neuritenentwicklung in Neuro2a-Zellen

N2A-Zellen wurden transfiziert und in Medium mit 10% FBS kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen differenziert, indem zu Medium mit 0,2% FBS gewechselt wurde. (A) Überlagerung des Durchlichtbildes und der GFP-Fluoreszenz (grün) der mikroskopischen Analyse von undifferenzierten (oben) sowie differenzierten (unten) Zellen, die mit GFP-TU3A exprimierenden Plasmiden (rechts) oder GFP als Kontrolle (links) transfiziert wurden. Maßstab: 50 μm . *Rechts*: Quantifizierung der mittleren Neuritenlänge (+SEM von 132 Zellen für TU3A- und 108 GFP-Kontrollzellen) (oben) und % der Zellen mit Neuriten (unten) mit Hilfe der Software *ImageJ*. (B) N2A-Zellen wurden mit GFP-TU3A transfiziert und differenziert wie in (A). Anschließend wurden die Zellen fixiert, gefärbt und mittels LSM analysiert. *Links*: GFP-Fluoreszenz zeigt TU3A-Lokalisation. *Mitte*: Visualisierung von F-Aktin mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin. *Rechts*: Überlagerung (merge) zeigt Lokalisation von TU3A (grün) und Koloalokalisation von TU3A mit F-Aktin (rot) in punktförmigen Clustern. Pfeilspitzen deuten auf die in den oberen Einsätzen vergrößerten Bereiche. Abbildungen zeigen maximale Projektion von 4 Einzelbildern. Maßstab 25 μm .

GFP-TU3A überexprimierende Zellen zeigten jedoch im Vergleich zu untransfizierten Zellen eine dramatische Reduktion in der Neuritenentwicklung, nachdem die Differenzierung durch Serumentzug induziert wurde. Nach TU3A-Überexpression war sowohl die Anzahl der Zellen, die Neuriten ausbilden, als auch die Neuritenlänge reduziert. Dieser Effekt war spezifisch für TU3A, da Zellen, die GFP alleine exprimierten, keine veränderte Ausbildung der Neuriten aufwiesen (Abb. 27, A). Auffallend war, dass GFP-TU3A überexprimierende N2A-Zellen punktartige F-Aktin Akkumulationen ausbildeten, die in untransfizierten Zellen weniger abundant waren (Abb. 27, B). Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass nach TU3A-Überexpression in N2A-Zellen, begleitend zu einer reduzierten Neuritenentwicklung, Veränderungen in der Aktindynamik auftreten.

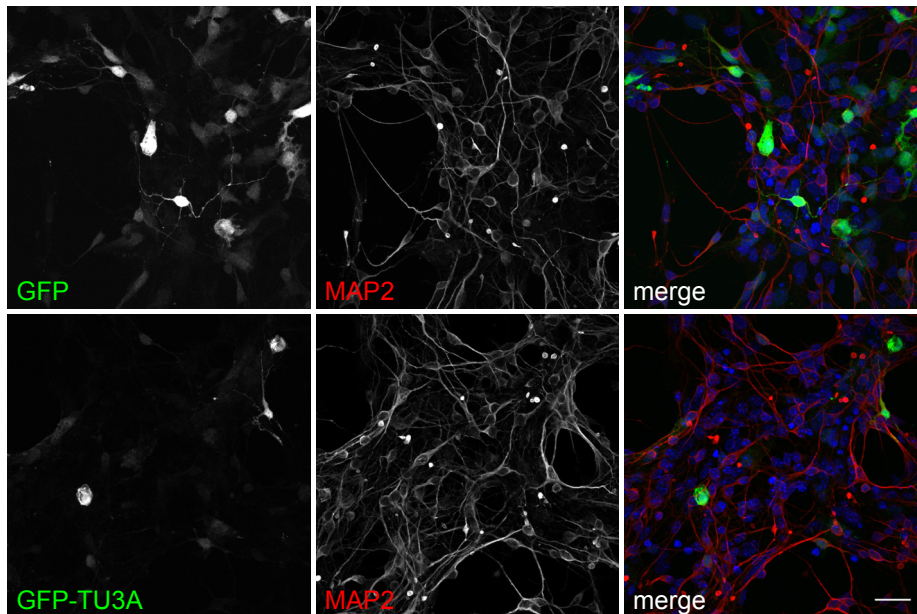


Abb. 28 TU3A-Überexpression beeinflusst Neuritenbildung in primären Neuronen

Primäre hippocampale Neuronen aus der Ratte wurden mit GFP-TU3A (Reihe unten) oder GFP (Reihe oben) exprimierenden Plasmiden transfiziert, 42 h kultiviert, anschließend fixiert, gefärbt und mittels LSM analysiert. *Links*: GFP-Fluoreszenz zeigt transfizierte Zellen. *Mitte*: Visualisierung von Neuronen durch MAP2-Immunfluoreszenz. *Rechts*: Überlagerung (merge) der GFP-Fluoreszenz (grün) mit der MAP2-Immunfluoreszenz (rot) und der DAPI-Färbung (blau) zeigte eine Reduktion der Neuritenlänge in GFP-TU3A exprimierenden Neuronen. Abbildungen zeigen maximale Projektion von 4 Einzelbildern. Maßstab 25 μm .

Um den Einfluss von TU3A auf die Neuritenentwicklung in Primärneuronen zu untersuchen, wurden Hippocampusneuronen direkt nach der Präparation transfiziert, 42 h nach der Transfektion fixiert und mittels LSM analysiert. Mit GFP transfizierte Neuronen entwickelten lange verzweigte Neuriten, die durch MAP2-Färbung visualisiert wurden. (Abb. 28, Reihe oben). Im Vergleich dazu zeigten mit GFP-TU3A transfizierte Neuronen eine stark reduzierte Neuritenentwicklung (Abb. 28, Reihe unten).

4.2.11 TU3A beeinflusst nicht die Morphologie von bereits entwickelten Neuriten in Neuro2a-Zellen

Nach dem Befund, dass TU3A-Überexpression die Entwicklung von Neuriten in N2A-Zellen inhibieren kann, stellte sich die Frage, ob TU3A einen Einfluss auf die Morphologie von bereits ausgebildeten Neuriten ausüben kann. Zur Klärung dieser Frage wurden Plasmide konstruiert, die eine kontrollierte, durch Tetrazyklin induzierbare Expression von TU3A erlauben. Bei diesem System wird die Expression von TU3A durch die Coexpression eines Transrepressors (TR) reprimiert. Dieser Transrepressor verändert durch Tetrazyklinbindung seine Konformation, so dass dieser nicht mehr an die DNA binden kann und die Expression von TU3A dereprimiert wird. N2A-Zellen wurden mit den Plasmiden für das reprimierbare TU3A-TO, dem Transrepressor pcDNA6-TR und GFP als Transfektionsmarker transfiziert. Transfizierte Zellen wurden differenziert und die TU3A-Expression durch Dereprimierung des tetrazyclinsensitiven TR induziert. Nach Induktion der TU3A-Expression für 12 h mit 2 µg/ml Tetrazyklin wurden die Zellen fixiert und mittels LSM analysiert. Die Immunfluoreszenz mit TU3A-Antikörpern zeigte, dass Zellen, die positiv für GFP waren, zudem auch TU3A ektopisch exprimierten. Die TU3A-Färbung lokalisierte überwiegend in den Neuriten und colokalisierte mit F-Aktin. Offensichtliche Veränderungen in der Morphologie der Neuriten waren nach Induktion der TU3A Expression für 12 h nicht erkennbar (Abb. 29). Die Expression von TU3A in Abwesenheit von Tetrazyklin war vollständig reprimiert, da Zellen, die mit den gleichen Plasmiden transfiziert waren, jedoch nicht mit Tetrazyklin inkubiert wurden, keine TU3A-Färbung zeigten (Daten nicht gezeigt).

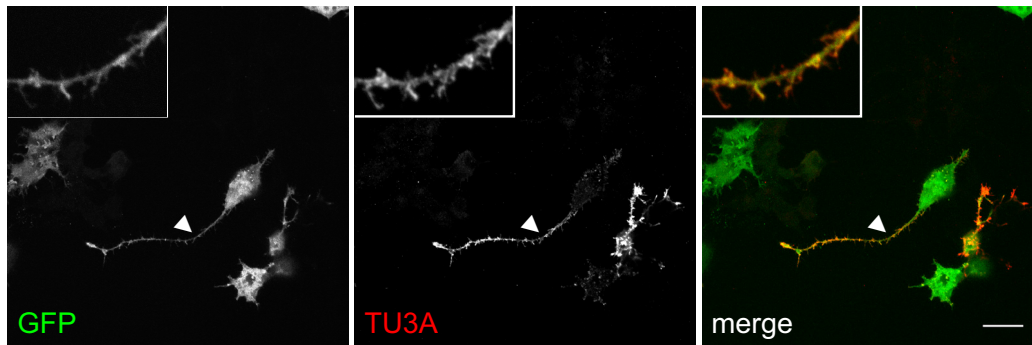


Abb. 29 Induziertes TU3A lokalisiert in Neuro2a-Neuriten

N2A-Zellen wurden mit Plasmiden zur Expression des induzierbaren TU3A und EGFP als Marker transfiziert und differenziert, wie in Abb. 27. Anschließend wurde die Expression von TU3A durch 2 µg/ml Tetrazyklin induziert, die Zellen nach 24 h fixiert, gefärbt und mittels LSM analysiert. *Links*: GFP-Fluoreszenz zeigt transfizierte Zellen. *Mitte*: Visualisierung von TU3A mittels Immunfluoreszenz. *Rechts*: Überlagerung (merge) zeigt die N2A-Zellmorphologie durch EGFP (grün) und Lokalisation von TU3A (rot) in den Neuriten. Pfeilspitzen deutet auf die in den oberen Einsätzen vergrößerten Bereiche. Vergrößerung zeigt maximale Projektion von 4 Einzelbildern. Maßstab 25 µm.

4.2.12 TU3A hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität

Eine verminderte Neuritenentwicklung könnte durch einen cytotoxischen Effekt aufgrund der TU3A-Überexpression vermittelt werden. Um einen Effekt der TU3A-Überexpression auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurden MTT-Assays durchgeführt. Sowohl in Neuro2a Zellen als auch in HEK-293-Zellen, die sich durch eine erhöhte Transfektionseffizienz auszeichnen, wurde kein signifikanter Effekt auf die Zellviabilität nach Überexpression von GFP-TU3A oder TU3A beobachtet (Abb. 30, A+B). Darüberhinaus zeigten GFP-TU3A überexprimierende N2A-Zellen kein positives Signal für die gesplante Caspase-3 (cl-Casp3) (Daten nicht gezeigt). Diese proteolytisch prozessierte Form der Caspase-3 kennzeichnet Zellen, in denen Apoptose induziert worden ist, und stellt somit einen sensitiven Marker für die Induktion eines zytotoxischen Prozesses dar. Als Kontrolle für die Immunfärbung der cl-Casp3 wurde Apoptose in N2A-Zellen induziert. Nach Inkubation der Zellen mit 1 µM Staurosporin für 3 h zeigte sich ein Anstieg der Zellen, die positiv für die gesplante Caspase-3 gefärbt wurden. Im Vergleich zu Zellen, die mit GFP alleine transfiziert wurden, zeigte sich kein Unterschied in der cl-Casp3-Färbung in GFP-TU3A überexprimierenden Zellen (Abb. 30, C+D).

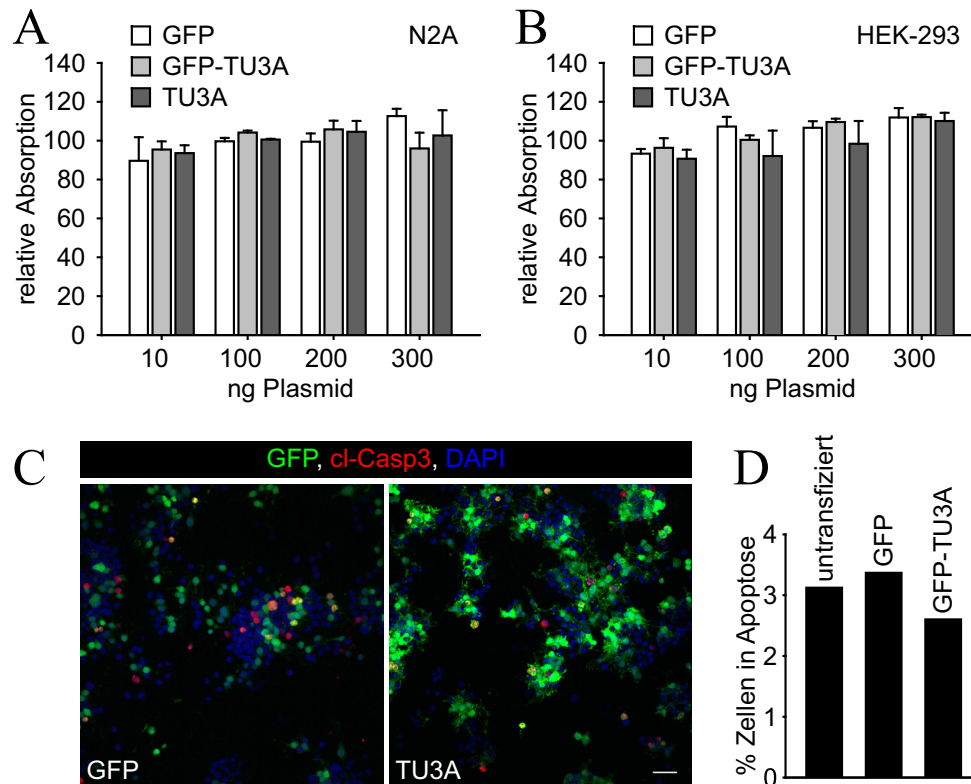


Abb. 30 TU3A-Überexpression beeinflusst nicht die Zellviabilität in Neuro2a- und HEK-293-Zellen

N2A (A) oder HEK-293 (B) Zellen wurden transfiziert und 24 h in Medium mit 10 % FBS kultiviert bevor die Zellviabilität mittels MTT analysiert wurde. Dargestellt ist die auf den Durchschnitt normalisierte relative Absorption bei 630 nm (+SEM von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Triplikaten) als Maß der Zellviabilität nach Transfektion von ansteigenden Mengen der Plasmide, die GFP (weiss), GFP-TU3A (hellgrau) oder unmarkiertes TU3A (dunkelgrau) exprimieren. (C) N2A Zellen wurden mit GFP-TU3A (rechts) oder GFP (links) als Kontrolle transfiziert und 24 h in Medium mit 10% FBS kultiviert. Zur Induktion der Apoptose wurden die Zellen für 3 h mit 1 μ M Staurosporin behandelt und anschließend fixiert, gefärbt und mittels LSM analysiert. Darstellung zeigt Überlagerung der GFP-Fluoreszenz (grün) zur Visualisierung von GFP oder GFP-TU3A exprimierenden Zellen mit dem Signal der Immunfluoreszenz zur Visualisierung von proteolytisch prozessierter Caspase-3 (cl-Casp3, rot) und DAPI (blau) für die Visualisierung aller Zellen. (D) Quantifizierung des prozentualen Anteils apoptotischer cl-Casp3-positiver Zellen durch Zählen von Zellen unter Verwendung der Software *ImageJ* (208 Zellen bei GFP- und 159 Zellen bei GFP-TU3A transfizierten Zellen).

5 Diskussion

An der Erforschung der molekularen Grundlagen von physiologischem Stress arbeiten weltweit viele Laboratorien mit jeweils spezifischem Forschungsschwerpunkt dieses vielschichtigen Geschehens. In der vorliegenden Arbeit wurden im ersten Teil Aspekte untersucht, die die Voraussetzung für die Aktivität von Stresshormonrezeptoren und verwandten Rezeptoren schaffen. Im zweiten Teil wurden die Auswirkungen der Aktivierung der Stressrezeptoren am Beispiel des TU3A-Proteins untersucht.

5.1 Eine umfassende Analyse der Rolle von TPR-Proteinen in SR-Heterokomplexen

Insbesondere von Untersuchungen am Glucocorticoidrezeptor (GR) und dem Progesteronrezeptor (PR) ist bekannt, dass die Aktivität verschiedener Steroidhormonrezeptoren (SR) durch TPR-Proteine moduliert werden kann. Für eine umfassende Analyse, welchen Einfluss die verschiedenen TPR-Proteine auf die Aktivität der Steroidhormonrezeptoren ausüben, wurde ein Reportersystem im miniaturisierten Format etabliert. Hierdurch konnte der hormonabhängige Anstieg der Rezeptoraktivität unter Bedingungen untersucht werden, bei denen durch Transfektion entsprechender Expressionsplasmide die relativen Mengen der TPR-Proteine verändert waren. Darüber hinaus wurde durch Immunpräzipitationen die Zusammensetzung der SR-Heterokomplexe untersucht. Die Reporteranalysen zeigten, dass die nahe verwandten Rezeptoren GR, MR und PR eine starke Expression der Fireflyluziferase durch den MMTV-Reporter vermitteln konnten. Der Anstieg der Fireflyaktivität folgte der für SR typischen Abhängigkeit von der Hormonkonzentration. Durch Messung der Rezeptoraktivität bei verschiedenen Hormonkonzentration konnte zwischen TPR-Proteineffekten bei *subsaturierender* und *saturierender* Hormonkonzentration unterschieden werden. AR, ER α und ER β zeigten zwar auch einen von der Dosis abhängigen Anstieg der Reporteraktivität, die Stimulation dieser Rezeptoren war jedoch wesentlich geringer als bei dem GR und PR. Der mit dem MMTV-Reporter gemessene AR und die mit dem ERE-Reporter gemessenen Östrogenrezeptoren konnten zudem die Reporter nur zu einem geringen Ausmaß aktivieren, so dass die normalisierten Fireflywerte deutlich unter den Werten des GR, MR und PR lagen. Der Vergleich der normalisierten Fireflywerte des AR mit den Werten der anderen durch den MMTV-Reporter gemessenen Rezeptoren zeigte, dass die Aktivität des AR mit diesem System nur unvollständig abgebildet werden kann. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer schlechten Bindung des AR an die HREs des MMTV-Promotors liegen.

Die normalisierten Fireflywerte der ER können nicht direkt mit den Fireflywerten der anderen Rezeptoren verglichen werden, da für die Messung der ER-Aktivität ein anderer Reporter verwendet worden ist. Die nahe am Gerätehintergrund liegenden Werte und die geringe Stimulierbarkeit könnten dadurch erklärbar sein, dass dieser ERE-Luc Reporter aus einem minimalem Promoter mit zwei EREs aufgebaut ist. Hierdurch könnte man darauf schließen, dass die Effekte der TPR-Proteine auf die ER-Aktivität nicht ausreichend mit diesem Reporter dargestellt werden können. Obwohl der MR den MMTV-Reporter gut aktivieren konnte, wurde er durch Hormongabe nur 3,2-fach stimuliert. Diese geringe Stimulierbarkeit des MR war auf eine starke Hintergrundaktivität des Rezeptors zurückzuführen, die deutlich über der Hintergrundaktivität der anderen Rezeptoren lag. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass dieser transkriptionell aktive MR in steroidfreiem Medium auch überwiegend im Nukleus lokalisiert (Abb 15). Die bisher publizierten Daten zur subzellulären Lokalisation des MR in Abwesenheit von Hormon lassen keinen klaren Schluss zu dieser Fragestellung zu. So wurden sowohl Studien publiziert, die eine MR-Lokalisation im Zytoplasma, als auch solche, die ihn im Nukleus zeigen (Fejes-Toth, 1998; Lombes, 1994; Nishi, 2001). Es ist bekannt, dass der MR eine zehnmal höhere Affinität für Corticosteroide besitzt als der GR (Reul, 1985). Die im Vergleich zum GR höhere basale Aktivität des MR könnte somit theoretisch durch verbleibende Corticosteroide im Serum erklärt werden, deren Konzentration hoch genug ist, um den hochaffinen MR zu aktivieren. Diese Erklärung kann jedoch ausgeschlossen werden, da mittels einer HPLC-Analyse festgestellt wurde, dass das durch Aktivkohlebehandlung hergestellte steroidfreie Serum keine Corticosteroide in Konzentrationen enthält, die den MR aktivieren können (Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigte sich, dass andere im steroidfreien Medium befindliche Substanzen den MR aktivieren können, da die Aktivität des MR durch Inkubation in Kulturmedium ohne Serum auf Werte reduziert werden konnte, die mit den basalen Aktivitäten der anderen Rezeptoren vergleichbar waren. Die Reduktion der transkriptionellen Aktivität spiegelte sich auch in einer Verschiebung der subzellulären Lokalisation wider. Die Aktivierung des MR durch diese im Serum befindlichen Liganden war zudem additiv zu der durch Fludrocortisol vermittelten Aktivierung (Abb.15).

Die Effekte der TPR-Proteine auf die transkriptionelle Aktivität der Rezeptoren bei subsaturierenden Hormonkonzentrationen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die ausgeprägtesten Effekte zeigten sich auf die Aktivität der Rezeptoren, die am besten in dem MMTV-Reportersystem aktiviert werden konnten. Diese Effekte zeigten jedoch nur einen negativ modulatorischen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität der Rezeptoren. Ein positiv modulatorischer Einfluss auf die Reporteraktivität wurde nur in einem geringen

Ausmaß gemessen. Die Tatsache, dass in diesen Studien überwiegend inhibitorische Effekte gemessen wurden, kann auf das hier verwendete zelluläre System zurückgeführt werden. SR haben sich für die Signalübertragung in multizellulären Organismen entwickelt. In der Hefe fehlen diese Rezeptoren und notwendige Regulatoren für eine steroidhormonabhängige Signaltransduktion. Ektopisch in der Hefe exprimierte SR zeigen im Gegensatz zu SR in Säugetierzellen eine geringe basale Aktivität. Dadurch zeigen aktivierende Faktoren in der Hefe Effekte, die in Säugetierzellen nicht identifiziert würden. Hefen und Säugetierzellen unterscheiden sich außerdem in ihrer basalen Hsp90-Aktivität. So zeigt Hsp90 in Säugetierzellen eine niedrige basale ATPase-Aktivität, die jedoch durch Klientenbindung stimuliert wird (McLaughlin, 2002). In der Hefe hingegen ist die basale ATPase-Aktivität höher (Prodromou, 1999; Richter, 2003). So wurden bei dem Vergleich eines durch Steroidhormone aktivierten Reportersystems aus der Hefe mit einem System in Säugetierzellen gegenläufige Effekte beobachtet (Riggs, 2003; Wochnik, 2005). Am Beispiel der Immunophiline FKBP51 und FKBP52 zeigte sich, dass FKBP51 die GR-Aktivität in Säugetierzellen inhibiert, während es in der Hefe keinen Effekt zeigt. Dagegen stimuliert FKBP52 die GR-Aktivität in der Hefe, aber nicht in den Säugetierzellen. Die Reportersysteme zur Messung der transkriptionellen Aktivität der SR unterscheiden sich somit zwischen Hefe und Säugetierzellen in der Grundaktivität, wodurch deren Aktivität präferentiell nur in eine Richtung moduliert werden kann. Die Effekte der TPR-Proteine auf die Aktivität der ER waren weniger stark ausgeprägt als bei dem GR, MR und PR. Diese Beobachtung könnte mit den publizierten Daten erklärt werden, nach denen die Aktivität der ER weniger stark von Hsp90 abhängt als die anderer SR (Binart, 1995; Picard, 1990), obwohl andere Studien einen Effekt von Hsp90 auf die Aktivität des ER gezeigt haben (Fliss, 2000).

	CHIP	Cyp40	FKBP51	FKBP52	PP5	TPR2	XAP2
GR	---	+/-	---	+/-	---	--	--
MR	--	+/-	--	-	-	--	-
PR	---	-	---	+/-	--	---	--
AR	-	-	--	+/-	--	--	--
ER α	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+
ER β	+	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-

Tabelle 1: Zusammenfassung der TPR-Proteineffekte auf die Transaktivierung der SR

Dargestellt sind die Effekte auf die Aktivität der SR im Reporterassay unter subsaturierender Hormonkonzentration. Vgl. Abschnitt 4.1.2. (-) leichte-, (--) mittlere und (---) starke negativ modulatorische Effekte, (+) leicht positiv modulatorische Effekte, (+/-) kein signifikanter Effekt.

5.1.1 CHIP

CHIP zeigte einen starken Effekt auf die Transaktivierung des GR, MR und PR, sowie den stärksten Effekt auf die Translokation des MR in Abwesenheit von Hormon. CHIP wurde bereits in GR-Heterokomplexen identifiziert (Connell, 2001). In dieser Studie konnte neben der GR-Interaktion zudem die Inkorporation von CHIP in MR-, PR- und AR-Heterokomplexe gezeigt werden. Der Vergleich zu den anderen TPR-Proteinen deckte auf, dass CHIP eine hohe Affinität für diese Rezeptorheterokomplexe besitzt. Trotzdem konnte die Effektstärke auf die Transaktivierung nicht direkt mit der Inkorporation in die Rezeptorheterokomplexe korreliert werden, da CHIP beispielsweise den AR trotz hoher Affinität nur moderat beeinflusste. Daneben ist bekannt, dass CHIP sowohl mit Hsp70 als auch mit Hsp90 interagiert (Ballinger, 1999). Die in der vorliegenden Studie beobachtete starke Assoziation von CHIP mit Hsp70 im Vergleich zur mittelstarken Hsp90-Assoziation deutet auf eine modulatorische Funktion von CHIP in frühen Stadien des Chaperonkreislaufs (Abb. 2). Man vermutet, dass CHIP den Chaperonkreislauf verlangsamt, indem es den Verbleib von Hsp90 in der ADP gebundenen Konformation vermittelt, in der Hsp90 nicht p23 bindet (Ballinger, 1999; Connell, 2001). Ob der durch CHIP vermittelte inhibitorische Effekt auf die Rezeptoraktivität durch einen verstärkten Abbau des Rezeptors verursacht wird, wie für den

GR, AR und ER α publiziert (Connell, 2001; Fan, 2005; He, 2004), konnte in der hier vorliegenden Studie nicht eindeutig geklärt werden. In den Immunoblots der Reporterassays zur Analyse der Rezeptorexpressionslevel wurden zwar teilweise Hinweise auf eine verminderte Rezeptorexpression durch die Überexpression von CHIP gefunden, jedoch war der Effekt aufgrund der generell hohen Variabilität der Rezeptorsignale nicht stabil reproduzierbar. Die im Vergleich zu den eingesetzten TPR-Proteinen geringen Plasmidmengen des Rezeptors im Reporterassay könnten eine mögliche Ursache für diese Variabilitäten darstellen, da die Unterschiede in der Rezeptorexpression bei den Präzipitationsexperimenten, in denen größeren Mengen Rezeptorplasmid verwendet worden sind, nicht beobachtet wurden.

5.1.2 Cyp40

Cyp40 zeigte einen schwach inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des PR, wobei Cyp40 keinen Einfluss auf den GR, MR und die ER ausübte. Cpr6, das Homolog zu Cyp40 in der Hefe, beeinflusst ebenso weder die Aktivität des GR und des ER, noch beeinflusst es die ATPase-Aktivität von Hsp90 (Duina, 1996; Prodromou, 1999; Warth, 1997). Es wurde jedoch kürzlich gezeigt, dass Cyp40 einen positiv modulatorischen Effekt auf die Aktivierung des AhR (*engl.* aryl hydrocarbon receptor) ausübt. Dieser Rezeptor aus der Klasse der Kernrezeptoren ist ebenso wie die SR ein Hsp90-Klient, und kann somit auch potentiell durch die als Hsp90-Cofaktor wirkenden TPR-Proteine beeinflusst werden. Cyp40 wurde ebenfalls bereits in SR-Heterokomplexen identifiziert (Pratt, 2003). In dieser Studie wurde die Inkorporation von Cyp40 in Heterokomplexe mit dem GR, MR, PR und AR bestätigt. Im Vergleich zu den anderen TPR-Proteinen wurde Cyp40 jedoch nur schwach in die Rezeptorheterokomplexe inkorporiert. Zudem zeigte der Vergleich der Hsp90-Bindung mittels Coimmunopräzipitation, dass FKBP51 und FKBP52 ähnlich stark und Cyp40 im Vergleich dazu schwach mit Hsp90 interagiert. Diese Interaktionen können die unterschiedlichen Affinitäten der TPR-Proteine für Hsp90 widerspiegeln. In einer anderen Studie wurden die Affinitäten dieser TPR-Proteine für die Bindung an Hsp90 *in vitro* mittels isothermaler Titrationskalorimetrie bestimmt (Pirkl, 2001). In dieser Studie ist die höchste Affinität für Hsp90 bei FKBP52, gefolgt von FKBP51 und Cyp40 identifiziert worden. Es wird davon ausgegangen, dass die verschiedenen TPR-Proteine in einer Zelle um die Bindung an einen SR-Heterokomplex kompetieren (Pratt, 2003). Daher wurde untersucht, ob Cyp40 den inhibitorischen Effekt eines anderen TPR-Proteins reduzieren kann. In den hier durchgeführten Experimenten konnte Cyp40 jedoch nicht den inhibitorischen Effekt von FKBP51 reduzieren. Dass die Aufhebung eines inhibitorischen Effekts in dem verwendeten

zellulären System möglich ist, konnte am Beispiel von FKBP52 gezeigt werden, welches den inhibitorischen Effekt von PP5 auf die GR-Aktivität aufgehoben hat (Abb. 8). In der Hefe konnte diese Kompetition zwischen PP5 und FKBP52 im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten nicht nachgewiesen werden, da die durch FKBP52 vermittelte Potenzierung der Rezeptoraktivität zwar durch FKBP51 blockiert werden konnte, jedoch nicht durch PP5 (Riggs, 2003). Das unterschiedliche Potential der verschiedenen TPR-Proteine, die Effekte auf die Rezeptoraktivitäten gegeneinander aufzuheben, könnte durch die unterschiedlichen Hsp90-Affinitäten erklärt werden. Somit konnte Cyp40, welches Hsp90 mit geringer Affinität bindet, nicht den inhibitorischen Effekt von FKBP51 auf die Rezeptoraktivität aufheben, da FKBP51 eine wesentlich höhere Affinität für Hsp90 besitzt (Abb. 14). FKBP52 interagiert stärker mit Hsp90 als PP5 und konnte daher auch den inhibitorischen Effekt von PP5 aufheben. FKBP52, das ähnlich effizient Hsp90 präzipitiert wie FKBP51, konnte im Vergleich dazu den inhibitorischen Effekt von FKBP51 auf die Aktivierung des GR aufheben (Wochnik, 2005). Daneben wurde berichtet, dass FKBP52 den inhibitorischen Effekt von XAP2 aufheben kann, das eine im Vergleich zu FKBP52 geringe Affinität zu Hsp90 besitzt und die Bindung von XAP2 an Hsp90 reduziert (Laenger, 2009).

5.1.3 PP5

Während CHIP, FKBP51 und TPR2 uniform inhibitorische Effekte auf die Aktivitäten der nahe verwandten Rezeptoren GR, MR und PR ausübten, wurden bei einigen TPR-Proteinen differentielle Effekte gemessen. Interessanterweise zeigte PP5 einen sehr starken inhibitorischen Effekt auf den GR, selbst bei geringen Mengen von PP5-Expressionsplasmiden. Die Aktivität des MR wurde im Gegensatz dazu erst bei 20-fach höheren Plasmidmengen moderat inhibiert. Ein potentieller Einfluss auf die PP5-Level durch die Coexpression des Rezeptors konnte mittels Immunoblotanalysen ausgeschlossen werden (Abb. 7). Dieser differentielle Effekt von PP5 konnte nicht durch unterschiedliche Affinitäten für die jeweiligen Rezeptorheterokomplexe erklärt werden, wie den in Tabelle 2 zusammengefassten Ergebnissen der Präzipitationsexperimente zu entnehmen ist.

	CHIP	Cyp40	FKBP51	FKBP52	PP5	TPR2	XAP2
GR	++	+/-	+++	+	+	++	+/-
MR	++	+	+++	+	+	++	+
PR	+++	+/-	+++	+	+	++	+/-
AR	+++	+/-	++	+	+	+++	+/-
Hsp90	+	+	+++	+++	++	+	+
Hsp70	+++	-	+	-	-	++	-
p23	+/-	+/-	+++	++	++	+/-	+/-

Tabelle 2: Zusammenfassung der Assoziationen von TPR-Proteinen mit SR-Heterokomplexen und Chaperonen.

Dargestellt sind die relativen Affinitäten der TPR-Proteine in den Immunpräzipitationsexperimenten. Vgl. Abschnitt 4.1.6. (+) leichte-, (++) mittlere und (+++) starke Assoziation, (-) keine Assoziation, (+/-) vereinzelt detektierte Assoziation.

Diese Befunde lassen die Hypothese zu, dass PP5 ein Differenzierungsfaktor ist, der die physiologisch wichtige Balance zwischen den Aktivitäten des MR und des GR modulieren kann. Ein Anstieg der PP5-Expression kann somit den GR inhibieren, während es die Aktivität des MR unbeeinflusst lässt. PP5 könnte somit ein wichtiger Regulator der Glucocorticoideffekte im ZNS sein. Die physiologische Relevanz von PP5 ist trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren nur teilweise verstanden. Mehrere Beobachtungen sprechen dafür, dass PP5 eine Rolle bei der Regulation der Stressadaptation spielen könnte. Zum einen sind die höchsten Expressionslevel in Neuronen detektiert worden (Bahl, 2001). Zum anderen wurde in verschiedenen Neuronenpopulationen, unter anderem den parvozellulären Neuronen des Nucleus Paraventricularis und Pyramidal Zellen des Hippocampus, eine zelluläre Colokalisation mit dem GR identifiziert, so dass die Möglichkeit für eine Regulation der GR-Aktivität durch PP5 *in vivo* besteht (Rossie, 2006). Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass PP5 einen negativ modulatorischen Effekt auf die Sezernierung von ACTH in der Hypophysentumorzelllinie AtT20 vermittelt (Liu, 2005). Falls dieser Effekt von PP5 über den GR vermittelt würde, scheint dieser Befund für eine Stimulierung des GR durch PP5 zu sprechen, da der GR die POMC-Expression und somit die ACTH-Ausschüttung inhibiert. Studien, die den Einfluss von PP5 auf die Aktivität von SR untersuchten, beobachteten

teilweise gegensätzliche Effekte. So agiert die TPR-Domäne von PP5 als dominantnegative Mutante und blockiert die GR-abhängige Transkription in CV-1 Zellen (Chen, 1996). Im Vergleich dazu stimuliert die Überexpression der PP5-TPR-Domäne die Transaktivierung des ER α und ER β in HEK-293 Zellen, während die Überexpression des Volllängen-PP5 die Aktivität dieser Rezeptoren inhibiert (Ikeda, 2004). Dieser Effekt wird vermutlich durch die Dephosphorylierung eines stimulierenden Phosphatrests am ER durch PP5 vermittelt. Die Reduktion der zellulären PP5-Level mittels siRNA erzeugte in verschiedenen Studien gegensätzliche Effekte. Zum einen beeinflusste die Reduktion der PP5-Level die Aktivität eines GR-Reporters positiv (Zuo, 1999), daneben wurde in einer anderen Studie mittels RT-PCR gezeigt, dass PP5-siRNA zu einer Reduzierung der Transkription einiger Gene führt, die endogen durch die Aktivität des GR reguliert werden (Wang, 2007; Zuo, 1999).

In der Hefe hat PP5 einen positiv modulatorischen Effekt auf die Aktivität eines GR Reporters. Es wurde gezeigt, dass PP5 Hsp90 dephosphoryliert und hierdurch die Faltungsaktivität dieses Chaperons beeinflusst (Wandinger, 2006). Ungeklärt ist hierbei die Frage, welchen Einfluss die Phosphataseaktivität von PP5 auf die Aktivität der SR-Aktivität in Säugetierzellen ausübt. Die Ergebnisse in dieser Studie unterstützen ein Modell, in dem eine präzise Regulation der Phosphataseaktivität die Aktivität der Rezeptoren bestimmt. So kann die Beobachtung, dass die PP5-H304-Mutante mit ausgeschalteter Phosphataseaktivität den GR stärker inhibiert als der PP5-WT mit einem positiven Effekt der Phosphatase auf die GR-Aktivität erklärt werden, wie er für die PP5 in der Hefe gezeigt worden ist (Wandinger, 2006). Da auch die PP5-E76A-Mutante mit erhöhter Phosphataseaktivität den GR stärker inhibiert als der PP5-WT, scheint die Phosphatase auch einen negativ modulatorischen Effekt auf die SR-Aktivität zu vermitteln. Eine frühe Studie unterstützt diese Beobachtung zudem indirekt, da gezeigt wurde, dass der PP5-Phosphataseinhibitor Okadaic Acid die GR-Aktivität erhöht (Somers, 1992). Somit ist wahrscheinlich, dass PP5 die Aktivität der SR durch Dephosphorylierung verschiedener Proteine reguliert.

5.1.4 FKBP51 und FKBP52

Der Einfluss der Immunophilin FKBP51 (FKBP5) und FKBP52 (FKBP4) auf die Aktivierung von SR wurde bereits intensiv untersucht. So wurde publiziert, dass FKBP51 die Aktivität des GR und des PR in Säugetierzellen inhibiert, indem die Hormonbindungsaffinität des Rezeptors reduziert wird (Denny, 2000; Hubler, 2003; Scammell, 2001). In der Hefe inhibiert FKBP51 zwar nicht die Aktivität des GR direkt, jedoch kann FKBP51 den durch FKBP52 vermittelten, stimulatorischen Effekt aufheben. In dieser Studie war der stimulatorische Effekt von FKBP52 auf die Transaktivierung spezifisch für den GR, da die

Aktivität des ER nicht beeinflusst wird (Riggs, 2003). Umgekehrt zeigt FKBP52 keinen Effekt auf die Aktivität des GR in Säugetierzellen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass FKBP52 den inhibitorischen Effekt von FKBP51 auf die GR-Aktivierung reduziert (Wochnik, 2005). Studien, bei denen diese Gene deletiert wurden, zeigten einen essentiellen Einfluss von FKBP52 auf physiologische Prozesse, die durch den AR und PR vermittelt werden. Für die Maus mit der Deletion des FKBP51-Gens wurde hingegen kein prominenter physiologischer Effekt publiziert (Cheung-Flynn, 2005; Tranguch, 2005; Yang, 2006; Yong, 2007). In der vorliegenden Arbeit zeigten die Immunophilinen FKBP51 und FKBP52 gegenläufige Effekte auf die Transaktivierung des GR, MR, PR und AR.

Frühere Studien zur Zusammensetzung von SR-Heterokomplexen identifizierten FKBP51, FKBP52 und PP5. Es wurde vermutet, dass PP5 mit GR-Komplexen ähnlich wie FKBP51 interagiert, wobei FKBP51 in PR-Komplexen im Vergleich zu PP5 präferentiell inkorporiert wird (Riggs, 2004). Daneben wurde gezeigt, dass FKBP51 präferentiell gegenüber FKBP52 in GR-Heterokomplexen inkorporiert wird. In der gleichen Studie wurde auch gezeigt, dass Hormonbindung einen Austausch dieser Immunophilinen und somit unter Hormon eine präferentielle Kopräzipitation von FKBP52 gegenüber FKBP51 in GR-Heterokomplexen bewirkt (Davies, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass FKBP51 stärker in Rezeptorheterokomplexen inkorporiert wird als FKBP52, obwohl bei diesen beiden TPR-Proteinen ähnliche Affinitäten für Hsp90 beobachtet wurden. Hsp90 vermittelt zudem die Interaktion dieser TPR-Proteine mit p23 (Ali, 2006). Da in FKBP51-Komplexen mehr p23 gefunden wurde als in Komplexen mit FKBP52, könnte der inhibitorische Effekt von FKBP51 durch die Rekrutierung von p23 vermittelt werden, das in höheren Mengen als GR-Inhibitor identifiziert worden ist (Freeman, 2002; Wochnik, 2004). Die differentielle Interaktion von FKBP51 und FKBP52 mit Hsp70 könnte zu dem inhibitorischen Effekt von FKBP51 beitragen. FKBP51 könnte, ähnlich wie für TPR2 beschrieben (Brychzy, 2003), die Reifung des SR auf der Hsp70 basierten Zwischenstufe blockieren. Die SR, die mit FKBP51 die Hsp90-Stufe erreichen, sind tendenziell in Heterokomplexen mit erhöhtem p23 eingebaut, was wahrscheinlich zu einer reduzierten Rezeptoraktivierbarkeit führt (Wochnik, 2004).

Zusammenfassend lassen diese Beobachtungen die Vermutung zu, dass die antagonistischen Effekte dieser Immunophilinen bezüglich der Rezeptoraktivität auf die Inkorporation in unterschiedlichen Schritten des Multichaperonkreislaufes zurückzuführen sind.

5.1.5 TPR2

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die Überexpression, als auch eine Reduzierung der TPR2-Proteinlevel, zu einer Inhibierung der Aktivität des PR und des GR führt (Brychzy, 2003; Moffatt, 2008). Zudem wurde publiziert, dass TPR2 mit PR-Heterokomplexen interagiert (Moffatt, 2008). Der Einfluss von TPR2 auf die anderen SR wurde bisher noch nicht publiziert. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass TPR2 stark mit Heterokomplexen des GR, MR, PR und AR interagiert. Zudem war TPR2 das einzige der untersuchten TPR-Proteine, das einen negativ modulatorischen Effekt auf die Transaktivierung aller SR zeigte. Während die Effekte der meisten TPR-Proteine, welche die Aktivität der Rezeptoren bei subsaturierender Konzentration inhibierten, bei saturierenden Hormonkonzentrationen weniger stark ausgeprägt waren, zeigte TPR2 im Vergleich zu den anderen TPR-Proteinen, bei der höchsten Hormonkonzentration den stärksten inhibitorischen Effekt auf alle SR. Zudem beeinflusste TPR2 die Translokation des MR nur gering, obwohl die MR-Aktivität stark durch TPR2 beeinflusst wurde. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass TPR2 nicht die Hormonbindungsaffinität reduziert, sondern vielmehr die Rezeptoraktivität nach Hormonbindung und Rezeptortranslokation beeinflusst. Da TPR2 simultan sowohl mit Hsp70 als auch mit Hsp90 über zwei verschiedene TPR-Domänen innerhalb eines Moleküls interagieren kann, postulieren andere Modelle, dass TPR2 den retrograden Kliententransfer von Hsp90 auf Hsp70 vermittelt (Brychzy, 2003; Moffatt, 2008). In den Präzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass TPR2 stark mit Hsp70, jedoch nur moderat mit Hsp90 interagiert, was ein Modell unterstützt, in dem frühe Schritte während der Rezeptorreifung durch TPR2 beeinflusst werden, was in einer reduzierten Affinität resultieren würde.

5.1.6 XAP2

Die Inkorporation von XAP2 in SR-Heterokomplexe wurde bisher noch nicht nachgewiesen. *In vitro* transkribiertes XAP2 interagiert Hsp90-abhängig mit dem AhR. In derselben Studie konnte jedoch eine Interaktion mit dem GR nicht gezeigt werden (Carver, 1998). In aktuelleren Studien wurde XAP2 hingegen mit PPAR α und dem Thyroidhormonrezeptor 1 copräzipitiert (Froidevaux, 2006; Sumanasekera, 2003). Diese nukleären Rezeptoren sind näher mit SR verwandt als der AhR. Obwohl für XAP2 eine geringe Affinität für Hsp90 identifiziert worden ist, wurde dieser Faktor in Rezeptorheterokomplexe inkorporiert. Zudem inhibierte XAP2 die Aktivität des PR und des GR stark, wobei es jedoch nur einen moderaten Effekt auf den MR ausübte. Konsistent mit

dem moderaten Effekt auf die Aktivität des MR wurde auch die Translokation dieses Rezeptors nur moderat von XAP2 beeinflusst. Im Vergleich dazu wurde publiziert, dass XAP2 den AhR in Abwesenheit von Hormon gegen proteasomalen Abbau schützt und einen positiv modulatorischen Effekt auf die Aktivität des AhR ausübt, obwohl die Translokation dieses Rezeptor durch XAP2 reduziert wird (Kazlauskas, 2000; Meyer, 1998). Ebenso wurde vor kurzem gezeigt, dass XAP2 für die Stabilität und transkriptionelle Aktivierung des THR β 1 (*engl.* thyroid hormone receptor beta 1) notwendig ist, nicht jedoch für die des THR β 2 (Froidevaux, 2006). Somit scheint XAP2 verschiedene Kernrezeptoren, die als Hsp90-Klienten identifiziert worden sind, selektiv und differentiell zu regulieren.

5.2 Die molekulare Funktion des stressregulierten Proteins TU3A

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die molekulare Funktion des Proteins TU3A identifiziert werden, dessen Genaktivität durch Stress reguliert gefunden wurde. Da physikalische Interaktionen zwischen Proteinen funktionelle Wechselwirkungen vermitteln können, wurden zunächst die molekularen Interaktionspartner von TU3A mittels Immunpräzipitation identifiziert. In diesen Experimenten wurden Prdx1 und β -Aktin in Komplexen mit TU3A *in vitro* identifiziert und bestätigt.

Immunfluoreszenzanalysen zeigten weiterhin, dass TU3A in der Zelle mit F-Aktin, jedoch nicht mit Prdx1 colokalisierte. Es wurde zudem in TU3A überexprimierenden Zellen Veränderungen des F-Aktinzytoskeletts beobachtet. Dies führte zu der Entscheidung, den Einfluss von TU3A auf die Funktion von Aktin im Detail zu untersuchen, obwohl trotz fehlender zellulärer Colokalisation mit Prdx1 eine funktionelle Wechselwirkung zwischen TU3A und Prdx1 nicht ausgeschlossen werden kann.

Das Aktinzytoskelett vermittelt nicht nur die Morphologie und Polarität einer Zelle, sondern beeinflusst zudem Endozytose und intrazelluläre Proteinbewegungen (*engl.* trafficking) sowie Kontraktionen, Zellbewegungen und Zellteilung. Der Verlauf der Polymerisation von monomeren G-Aktin in Aktinfilamente gliedert sich in die Keimbildungs-, die Elongations- und die Gleichgewichtsphase, bei der das Filament die gleiche Länge behält, obwohl ein ständiger Austausch von Aktinmolekülen stattfindet (Abb. 31). Das dynamische Gleichgewicht der Aktinpolymerisation sowie die Verknüpfung der Filamente zu höher organisierten Netzwerken wird durch verschiedene an Aktin bindende Proteine beeinflusst. (Gourlay, 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass TU3A ein Aktin-bündelnder Faktor (*engl.* bundling factor) ist. Aktin-bindende Faktoren, welche die Filamente quervernetzen und dadurch bündeln, stabilisieren die Filamente, da das Verhältnis von lateralen zu longitudinalen Interaktionen zwischen den Filamenten innerhalb eines Bündels erhöht wird. Hierdurch verschieben bündelnde Faktoren das Polymerisationsgleichgewicht zur F-Aktin-Form, da durch die erhöhte Stabilität die Depolymerisation reduziert wird (Abb. 31). Die Copelletion von rekombinantem TU3A mit *in vitro* polymerisiertem F-Aktin lässt auf eine direkte Interaktion von TU3A mit F-Aktin schließen (Abb. 23).

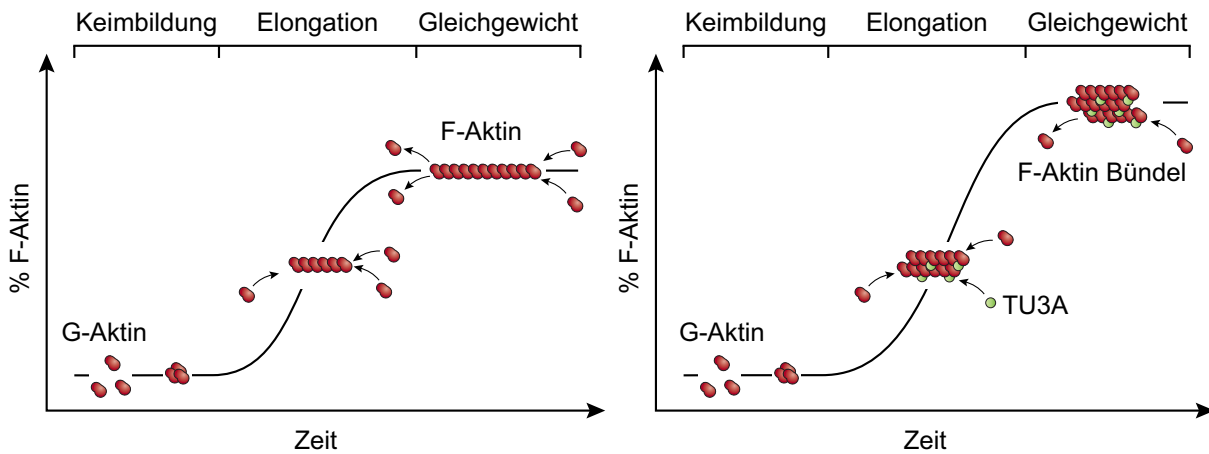


Abb. 31 Schematische Darstellung der durch TU3A beeinflussten Aktinpolymerisation

Die Polymerisation von Aktin gliedert sich in drei Phasen. In der Keimbildungsphase (*engl. lag-Phase*) lagern sich G-Aktin-Monomere zu stabilen Komplexen zusammen, die als Keim für die Filamentbildung dienen. Während der Elongation werden die Keime durch Anlagerung weiterer G-Aktin-Moleküle an beiden Enden des Filaments verlängert. In der Gleichgewichtsphase entspricht die Rate der Monomeranlagerung der Dissoziationsrate, so dass sich die Filamentlänge nicht verändert, obwohl die Untereinheiten ständig ausgetauscht werden. *Links*: Die Polymerisation von Aktin *in vitro* führt zu langen ungebündelten Filamenten. *Rechts*: TU3A bündelt und stabilisiert Aktinfilamente wodurch die Dissoziation reduziert und mehr F-Aktin gebildet wird.

Diese Interaktion hat auch funktionelle Auswirkungen, da das Aktinpolymerisationsgleichgewicht zur F-Aktin-Form verschoben wurde. Dieser Effekt wurde deutlich, indem die Polymerisation von Pyren-markiertem Aktin über die Zeit verfolgt wurde. Durch die Observation der Aktinpolymerisation in Anwesenheit von TU3A zeigte sich, dass TU3A vermutlich die Depolymerisation beeinflusst, da während der Elongationsphase zunächst weniger F-Aktin als in der Kontrolle gebildet wurde und der Effekt auf die Menge der gebildeten Filamente erst sichtbar wurde, als sich die Reaktion dem Fließgleichgewicht näherte (Abb. 24). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass in Anwesenheit von TU3A signifikant mehr F-Aktin pelletiert wurde, wenn durch Verdünnung die Depolymerisation von präformierten Aktinfilamenten induziert wurde (Abb. 25). TU3A zeigte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Filamentpelletierung, wenn Aktin in Anwesenheit von TU3A polymerisiert wurde. Dieser scheinbare Widerspruch kann durch den zeitlichen Verlauf der Aktinpolymerisation erklärt werden. In den replizierten Experimenten der Pyren-Aktinpolymerisation wurden allgemeine Variabilitäten bezüglich der

Geschwindigkeit beobachtet, mit der die Reaktion das Polymerisationsgleichgewicht erreicht. Der Effekt von TU3A auf das Gleichgewicht war hiervon jedoch unbeeinflusst. So ist es wahrscheinlich, dass die Verhältnisse von F- zu G-Aktin im Pelletierungsassay den Zeitpunkt der Aktinpolymerisation widerspiegeln, bei dem die Reaktion den Punkt noch nicht überschritten hat, an dem der Effekt des TU3A auf das Polymerisationsgleichgewicht signifikant sichtbar wurde. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass TU3A auch mit der globulären Form von Aktin interagiert. So verschieben beispielsweise G-Aktin bindende Aktinkeimbildungsfaktoren das Polymerisationsgleichgewicht auch zur filamentösen Form (Ahuja, 2007). Die Hypothese, dass TU3A das Bündeln von Aktinfilamenten vermittelt, wurde darüber hinaus durch die Visualisierung der Aktinfilamente unterstützt. Hier zeigte sich, dass Filamente, die in Anwesenheit von TU3A gebildet wurden, kürzer sind als in der Kontrolle, jedoch auch dicker und ineinander verwunden (Abb. 26). Diese Morphologie ähnelt den Aktinfilamenten, die durch den Aktin-bündelnde Faktor slingshot-1 induziert werden (Kurita, 2007).

TU3A vermittelt auch Veränderungen in der Morphologie des Aktinzytoskeletts, die durch ein Bündeln von Aktinfilamenten erklärt werden können. So zeigten TU3A überexprimierende Zellen ausgeprägtere F-Aktinstrukturen als untransfizierte oder mit Kontrollprotein transfizierte Zellen (Abb. 18 + Daten nicht gezeigt). TU3A beeinflusste zudem das Neuritenwachstum in Neuro2a-Zellen und primären Neuronen. Diese Differenzierungsprozesse sind sensitiv gegenüber Veränderungen in der Aktindynamik (Wylie, 2003). Darüber hinaus unterstützt die Beobachtung von F-Aktinreichen Akkumulationen in Neuro2a-Zellen die Hypothese, dass die durch TU3A verursachte Inhibition der Neuritendifferenzierung durch Bündeln von Aktinfilamenten vermittelt wird. Interessanterweise wird in Patienten, die an Depressionen erkrankt sind, häufig eine Reduktion des Hippocampusvolumens gefunden (Campbell, 2004; Videbeck, 2004). Zurzeit werden verschiedene Möglichkeiten als zelluläre Ursachen für diese Beobachtung diskutiert. Hierbei ist von besonderer Bedeutung, dass auch nach chronischer Stressexposition Veränderungen in der Morphologie von Neuronen im Hippocampus beobachtet werden (Fuchs, 1995).

Da TU3A am stärksten im ZNS exprimiert wird (Su, 2004), wurde die subzelluläre Lokalisation des endogen exprimierten TU3A analysiert, wodurch Rückschlüsse auf eine potentielle *in vivo* Funktion von TU3A gezogen werden konnten. Hierzu wurden polyklonale Antikörper hergestellt, deren Spezifität für TU3A durch Färbungen in HeLa-Zellen belegt wurde. Da diese Zellen selbst kein TU3A exprimieren, wurden nur die Zellen durch den

TU3A-Antikörper gefärbt, die transfiziertes, mit GFP fusioniertes TU3A exprimierten. Die Färbung mit dem TU3A-Antikörper zeigte jedoch keine Fluoreszenz im Zellkern, im Gegensatz zur GFP-Fluoreszenz des GFP-TU3A-Fusionsproteins. Eine eingeschränkte Erreichbarkeit der nukleären TU3A-Epitope durch die TU3A-IgG-Antikörper konnte ausgeschlossen werden, da im selben Präparat IgG-Antikörper gegen das GFP-Epitop-Strukturen im Nukleus anfärben konnten. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte die proteolytische Prozessierung von TU3A sein, die zu einer Akkumulation von GFP-Spaltprodukten im Nukleus führt. In der Tat wurden in der Immunoblotanalyse mehrere TU3A-Banden durch den TU3A-Antikörper und durch den FLAG-Antikörper, der N-terminal FLAG fusioniertes TU3A erkennt, detektiert (Abb 17 + 19, B). Ob diese proteolytische Prozessierung von physiologischer Relevanz ist, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Die Antikörper erkennen zudem endogen exprimiertes TU3A, da in Cerebellumlysaten, in der die TU3A-mRNA-Expression hoch ist, eine Bande in der erwarteten Höhe detektiert wurde, jedoch nicht in Lysaten des Hirnstammes, in dem die TU3A-mRNA-Expression niedrig ist. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen des TU3A-Proteins spiegelten die Regulation der mRNA-Level wider. In Lysaten aus dem Hippocampus und dem Hypothalamus konnte eine signifikante Regulation des TU3A-Proteins durch Dex gezeigt werden, die im Cerebellum jedoch nicht beobachtet wurde. Somit scheint die TU3A-Expression zelltypspezifisch durch Glucocorticoide reguliert zu werden.

Es zeigte sich, dass TU3A in punktförmigen Akkumulationen entlang Dendriten und Axonen lokalisiert. Darüber hinaus colokalisierte auch das endogen exprimierte TU3A mit F-Aktin. Eine detaillierte Analyse dieser Färbungen zeigte, dass in allen TU3A-Akkumulationen auch F-Aktin gefärbt wurde, jedoch zeigten nicht alle F-Aktin-Akkumulationen eine positive Färbung für TU3A. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Funktion von TU3A *in vivo* mit der Modulation von aktinabhängigen Prozessen assoziiert ist. Eine stabile Wechselwirkung mit TU3A ist jedoch nicht für alle Funktionen von Aktin notwendig.

Viele zentrale Prozesse des ZNS basieren auf der Funktion von Aktin und werden durch dynamische Veränderungen der Aktineigenschaften moduliert (Cingolani, 2008). In sich entwickelnden Neuronen beeinflusst Aktin die Bildung, Extension und Verzweigungen von Neuriten sowie die Synapsenbildung. In entwickelten Neuronen ist Aktin das abundanteste Zytoskelettprotein in den prä- und postsynaptischen Termini sowie in dendritischen Spines. Die Effizienz der synaptischen Signalübertragung wird dynamisch in Abhängigkeit der Verwendung eines synaptischen Kontakts moduliert. Dies kann durch

Veränderungen sowohl in der Prä- als auch der Postsynapse vermittelt werden. Die dendritischen Spines sind ein spezialisiertes, postsynaptisches Kompartiment, das die meisten der exzitatorischen synaptischen Stimuli im Gehirn überträgt (Yuste, 2004). Die synaptische Effizienz kann durch die Form der dendritischen Spines moduliert werden. So ist die Anzahl der NMDA (*N*-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren proportional zum Durchmesser der postsynaptischen Dichte (PSD) in der Spinemembran. Die Anzahl der AMPA (*engl.* α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid)-Rezeptoren hingegen ist proportional zur PSD-Fläche. Somit verändert sich das Verhältnis von NMDA- zu AMPA-Rezeptoren in Abhängigkeit der Spinemorphologie (Takumi, 1999). Die Form der Spines wird in Abhängigkeit der Frequenz moduliert, in der ein exzitatorisches Potential die Freigabe des Neurotransmitters Glutamat vermittelt. Eine Langzeitpotenzierung (LTP) genannte hochfrequente Stimulation führt zu einer Vergrößerung der Spines, niedrig frequente Langzeitdepression (LDP) führt zu einer Verkleinerung der Spines, während Stimulationen mit mittlerer Frequenz die Größe der Spines nicht verändern (Okamoto, 2004). Diese morphologischen Veränderungen basieren auf der Modulation der Dynamik des Aktinzytoskeletts. Die synaptische Effizienz kann zudem in der Präsynapse reguliert werden, wo Aktin die Mobilität und somit die Freigabe von Neurotransmittervesikeln beeinflusst (Dillon, 2005). Diese Modulationen der synaptischen Übertragung werden als physiologisches Korrelat für Gedächtnis und Lernen angesehen (Hebb, 1949). Aktin-bindende Proteine beeinflussen die Aktindynamik und somit die modulatorischen Prozesse der synaptischen Übertragung. So wurde beispielsweise gezeigt, dass der Aktin-bündelnde Faktor α -Aktinin die Länge und Anzahl von dendritischen Spines beeinflusst (Parnass, 2000). Fascin, ein anderes Aktin-bündelndes Protein, wurde daneben in Filopodien des Wachstumskegels von sich entwickelnden Axonen identifiziert, in denen es eine essentielle Funktion für die Ausbildung dieser Strukturen besitzt (Edwards, 1995; Sasaki, 1996; Vignjevic, 2006).

Darüber hinaus könnte aber auch die Interaktion von TU3A mit Prdx1 eine Modulation neurologischer Prozesse vermitteln. In diesem Zusammenhang erscheint interessant, dass die Aktindynamik auch als Bindeglied zwischen der Bildung von reaktivem Sauerstoff (ROS, *engl.* reactive oxygen species) und Apoptose bei zellulärer Seneszenz fungiert. So wurde gezeigt, dass eine Reduzierung der Aktindynamik zu einem Anstieg der ROS Produktion und zum daraus resultierendem Zelltod führt. Eine Steigerung der Aktindynamik führte zu einer Verlängerung der zellulären Lebensdauer (Gourlay, 2004). Veränderungen in der Zellviabilität werden auch mit stressassoziierten affektiven Störungen in Verbindung gebracht. So wird ein Anstieg von Apoptose in speziellen

Neuronenpopulationen nach chronischem Stress beobachtet (Heine, 2004). Zudem werden durch Antidepressiva vermittelte Veränderungen im Verhalten durch Inhibierung der Neurogenese reduziert (Santarelli, 2003). Obwohl die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse einen inhibitorischen Einfluss von TU3A auf die Aktindynamik belegen, wurde kein Effekt von TU3A auf die Zellviabilität oder auf die Apoptose identifiziert. Diese Beobachtung schließt nicht aus, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen TU3A und apoptotischen Prozessen besteht, der die Anwesenheit anderer zellulärer Faktoren benötigen könnte, die in dem untersuchten zellulären System nicht gegeben waren. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass andere Studien einen Einfluss von TU3A auf die Zellviabilität beobachten (Wang, 2000; Zhao, 2007).

Die parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Studien zeigten zudem, dass die ektopische TU3A-Überexpression im Hippocampus nicht nur das Gedächtnis und Lernen beeinflusst, sondern auch ein Verhalten in der Maus induziert, das auf ein weniger depressives Verhalten im Menschen übertragen wird. Zudem wurden in diesen Mäusen elektrophysiologische Veränderungen in der Reizweiterleitung hippocampaler Neuronen gemessen. Die Messungen zeigten zum einen, dass die Langzeitpotenzierung reduziert war und zum anderen einen Anstieg der PPF (*engl.* paired-pulse facilitation). Die PPF beschreibt ein Phänomen der kurzzeitigen synaptischen Plastizität, bei dem ein zweites EPSP (exzitatorisches postsynaptisches Potential) eine veränderte Amplitude im Vergleich zu einem vorherigen EPSP aufweist. Da die PPF als ein Phänomen gilt, das auf molekularen Veränderungen der Präsynapse beruht, die in einer veränderten Neurotransmitterfreigabe resultieren, lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass TU3A die synaptische Effizienz modifizieren könnte. Zudem kann die Beobachtung, dass TU3A in punktförmigen Clustern entlang von Neuriten angereichert ist, auf eine Lokalisation von TU3A in Synapsen oder dendritischen Spines schließen lassen.

Zusammenfassend betrachtet könnte TU3A somit ein bedeutsamer physiologischer Modulator der durch Stress vermittelten kognitiven Veränderungen sein.

5.3 Ausblick

Eine ausbalancierte und den jeweiligen Umwelt- und Stressbedingungen angepasste Aktivität der SR hat einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten und die Stimmung von höheren Lebewesen. Die Wirkweise der Steroidhormone wird gewebespezifisch durch Coregulatoren beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurde der Beitrag von TPR-Proteinen zu der von Steroidhormonen vermittelten Signaltransduktion umfassend untersucht. Weitere Studien müssen zeigen, inwieweit die Aktivität von SR *in vivo* durch die relativen Expressionslevel der TPR-Proteine im Vergleich zu anderen Coregulatoren determiniert wird. So könnten mit Expressionsstudien gekoppelte SR-Aktivitätsassays in verschiedenen Zelllinien oder in gewebespezifischen primären Zellkulturen Aufschluss darüber geben, ob die relative Abundanz der endogen exprimierten TPR-Proteine Aussagen über die Responsivität einer Zelle oder eines Gewebes zulassen. Diese Studien würden ermöglichen, gewebe- oder individualspezifische Reaktivitätsprofile für die Aktivierung von SR zu erstellen. Diese Profile könnten zum einen Aufschluss über prädiktive Parameter zur Diagnostik affektiver Pathologien geben, zum anderen die Identifizierung von neuen Zielstrukturen für die Entwicklung von stimmungsmulatorischen, pharmakologischen Substanzen ermöglichen.

Die Studien zur Funktion des durch Stress regulierten Proteins TU3A zeigten, dass dieses Protein die Aktinpolymerisation und die Neuritenentwicklung beeinflusst. Da in differenzierten Neuronen TU3A in punktförmigen Akkumulationen lokalisiert, könnten die elektrophysiologischen Effekte auf die synaptischen Übertragung sowie das veränderte Verhalten nach TU3A-Überexpression durch eine Modulation der Aktindynamik in synaptischen Kontakten erklärt werden. Neben der Analyse, ob TU3A in der Prä- oder Postsynapse lokalisiert, müssen weitere Studien untersuchen, wie genau die durch TU3A vermittelte Veränderung in der Aktindynamik in einer modulierten Reizweiterleitung resultiert. Weitere Forschungen könnten den Einfluss von TU3A auf Vesikelbewegungen innerhalb der Präsynapse, Modulationen der Spinemorphologie oder Veränderungen in der Rezeptordichte in der postsynaptischen Membran untersuchen. Da die Expression von TU3A durch Glucocorticoide und durch epigenetische Mechanismen reguliert wird (Awakura, 2008), könnten weiterführende Studien zur Expressionsregulation Aufschluss über die physiologischen Konsequenzen einer durch Stress vermittelten dauerhafte Veränderungen der genomischen Struktur geben. In diesem Zusammenhang könnte die detaillierte Untersuchung der mutmaßlichen Interaktion von TU3A mit der Histon-Methyltransferase PRMT5 weitere Mechanismen für eine durch Stress regulierte Modifikation der Chromatinstruktur aufdecken.

6 Zusammenfassung

Steroidhormone beeinflussen die Stimmung und das Verhalten eines Lebewesens durch die Regulation einer Vielzahl von physiologischen Prozessen. Affektive Erkrankungen sind häufig mit einer Dysregulation der durch Steroidhormone vermittelten Signaltransduktion assoziiert. Für die Erforschung dieser Krankheiten ist ein umfassendes Verständnis der durch Steroidhormone vermittelten molekularen Effekte sowie der Mechanismen notwendig, welche die Aktivität der SR bestimmen. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von verschiedenen TPR-Proteinen auf die Aktivität der SR untersucht sowie die molekulare Funktion eines durch Glucocorticoide regulierten Proteins identifiziert werden.

Der umfassende Vergleich von sieben TPR-Proteinen CHIP, Cyp40, FKBP51, FKBP52, PP5, TPR2 und XAP2 zeigte differentielle Effekte dieser Cochaperone auf die Aktivität der Steroidhormonrezeptoren GR, MR, PR, AR, ER α und ER β . Hierbei wurden zum einen Unterschiede zwischen den TPR-Proteinen in ihrem Potential, die Aktivität eines Rezeptors zu beeinflussen, identifiziert, zum anderen Unterschiede in der Stärke der Inhibition verschiedener Rezeptoren durch TPR-Proteine. Die Analyse des Bindungsprofils zwischen den Rezeptoren GR, MR, PR, AR zu den TPR-Proteinen zeigte, dass die TPR-Proteine CHIP, FKBP51 und TPR2, die effizient in die Rezeptorkomplexe inkorporiert wurden, auch die Aktivität dieser Rezeptoren stark beeinflussten. PP5 hingegen interagierte nur moderat mit den Komplexen, inhibierte aber die Aktivität des GR stark. Es konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von PP5 durch seine Phosphataseaktivität reguliert wird und die Interaktion mit Hsp90 benötigt. Zudem hat PP5 einen differentiellen Einfluss auf die Aktivität des GR und des MR. Es wurde gezeigt, dass steroidfreies serumhaltiges Medium die Translokation des MR und dessen transkriptionelle Aktivität induzieren kann. Die Analyse der subzellulären Rezeptorlokalisation sowie die differentiellen Interaktionen der TPR-Proteine mit verschiedenen Chaperonen des Multichaperonheterokomplex lassen zudem darauf schließen, dass die inhibitorischen Effekte der TPR-Proteine durch unterschiedliche molekulare Mechanismen vermittelt werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die molekulare Funktion des durch Stress regulierten Proteins TU3A identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die TU3A-Proteinlevel nach Stimulation mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason signifikant anstiegen. Durch Immunpräzipitationen wurden Prdx1 und β -Aktin als molekulare Interaktionspartner identifiziert. Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass TU3A mit F-Aktin

colokalisiert und Veränderungen in der Morphologie von Aktinfilamenten induziert. *In vitro* Experimente mit rekombinantem TU3A zeigten zudem, dass TU3A das Aktinpolymerisationsgleichgewicht verschiebt, indem Aktinfilamente gebündelt und dadurch stabilisiert werden. In Neuro2a Zellen und primären Hippocampusneuronen reduziert TU3A zudem die Entwicklung von Neuriten. Immunfluoreszenzanalysen konnten eine Expression von endogen exprimiertem TU3A in punkartigen Akkumulationen entlang der Neuriten zeigen, was eine synaptische Lokalisation von TU3A in Neuronen vermuten lässt. In Verbindung mit den Erkenntnissen der parallel durchgeführten *in vivo* Experimente lassen die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse die Hypothese zu, dass das durch Stress regulierte Protein TU3A einen Einfluss auf das Verhalten ausüben kann, indem es die synaptische Reizweiterleitung durch Veränderungen in der Aktindynamik moduliert.

7 Literaturverzeichnis

Ahuja, R., Pinyol, R., Reichenbach, N., Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M.M., und Qualmann, B. (2007). Cordon-Bleu Is an Actin Nucleation Factor and Controls Neuronal Morphology. *Cell* **131**, 337-350.

Ali, M.M.U., Roe, S.M., Vaughan, C.K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P.W., Prodromou, C., und Pearl, L.H. (2006). Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* **440**, 1013-1017.

Awakura, Y., Nakamura, E., Ito, N., Kamoto, T., und Ogawa, O. (2008). Methylation-associated silencing of TU3A in human cancers. *Int.J.Oncol.* **33**, 893-899.

Bahl, R., Bradley, K.C., Thompson, K.J., Swain, R.A., Rossie, S., und Meisel, R.L. (2001). Localization of protein Ser/Thr phosphatase 5 in rat brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **90**, 101-9.

Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.Y., und Patterson, C. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* **19**, 4535-4545.

Beato, M., Herrlich, P., und Schütz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851-857.

Berg, J.M. (1989). DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* **57**, 1065-1068.

Binart, N., Lombes, M., und Baulieu, E.E. (1995). Distinct functions of the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: effects of hsp90 deletion mutants. *Biochem.J.* **311 (Pt 3)**, 797-804.

Binder, E.B., Bradley, R.G., Liu, W., Epstein, M.P., Deveau, T.C., Mercer, K.B., Tang, Y., Gillespie, C.F., Heim, C.M., Nemeroff, C.B., Schwartz, A.C., Cubells, J.F., und Ressler, K.J. (2008). Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *JAMA* **299**, 1291-1305.

Binder, E.B., Salyakina, D., Lichtner, P., Wochnik, G.M., Ising, M., Pütz, B., Papiol, S., Seaman, S., Lucae, S., Kohli, M.A., Nickel, T., Kunzel, H.E., Fuchs, B., Majer, M., Pfennig, A., Kern, N., Brunner, J., Modell, S., Baghai, T., Deiml, T., Zill, P., Bondy, B., Rupprecht, R., Messer, T., Köhnelein, O., Dabitz, H., Bruckl, T., Müller, N., Pfister, H., Lieb, R., Mueller, J.C., Lohmussaar, E., Strom, T.M., Bettecken, T., Meitinger, T., Uhr, M., Rein, T., Holsboer, F., und Müller-Myhsok, B. (2004). Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nature Genetics* **36**, 1319-25.

Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A., und Pollard, T.D. (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**, 1007-1011.

- Borthwick, E.B., Zeke, T., Prescott, A.R., und Cohen, P.T.** (2001). Nuclear localization of protein phosphatase 5 is dependent on the carboxy-terminal region. *FEBS Lett* **491**, 279-84.
- Brychzy, A., Rein, T., Winklhofer, K.F., Hartl, F.U., Young, J.C., und Obermann, W.M.** (2003). Cofactor Tpr2 combines two TPR domains and a J domain to regulate the Hsp70/Hsp90 chaperone system. *EMBO J.* **22**, 3613-23.
- Butler, P.W. und Besser, G.M.** (1968). Pituitary-adrenal function in severe depressive illness. *Lancet* **1**, 1234-1236.
- Campbell, N.A.** (1998). *Biologie* (4te Edition), Spektrum Akademischer Verlag (Heidelberg)
- Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., und MacQueen, G.M.** (2004). Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am.J.Psychiatry* **161**, 598-607.
- Carey, M.P., Deterd, C.H., de, K.J., Helmerhorst, F., und de Kloet, E.R.** (1995). The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J.Endocrinol.* **144**, 311-321.
- Carver, L.A., LaPres, J.J., Jain, S., Dunham, E.E., und Bradfield, C.A.** (1998). Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J.Biol.Chem.* **273**, 33580-33587.
- Chen, M.-S., Silverstein, A.M., Pratt, W.B., und Chinkers, M.** (1996). The Tetratricopeptide Repeat Domain of Protein Phosphatase 5 Mediates Binding to Glucocorticoid Receptor Heterocomplexes and Acts as a Dominant Negative Mutant 10.1074/jbc.271.50.32315. *J.Biol.Chem.* **271**, 32315-32320.
- Chen, Y., Dube, C.M., Rice, C.J., und Baram, T.Z.** (2008). Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone. *J.Neurosci.* **28**, 2903-2911.
- Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Cox, M.B., Riggs, D.L., Suarez-Quian, C., und Smith, D.F.** (2005). Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling. *Mol.Endocrinol.* **19**, 1654-1666.
- Cingolani, L.A. und Goda, Y.** (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews Neuroscience* **9**, 344-356.
- Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K., und Schütz, G.** (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* **9**, 1608-1621.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J.H., Wu, Y.X., Thompson, L.J., Hohfeld, J., und Patterson, C.** (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nature Cell Biology* **3**, 93-96.

- Czar, M.J., Galigniana, M.D., Silverstein, A.M., und Pratt, W.B.** (1997). Geldanamycin, a heat shock protein 90-binding benzoquinone ansamycin, inhibits steroid-dependent translocation of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Biochemistry* **36**, 7776-7785.
- Czar, M.J., Lyons, R.H., Welsh, M.J., Renoir, J.M., und Pratt, W.B.** (1995). Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Mol.Endocrinol.* **9**, 1549-1560.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Cascio, C.S., Darlington, D.N., Jacobson, L., und Levin, N.** (1987). Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog.Horm.Res.* **43**, 113-173.
- Davies, T.H., Ning, Y.M., und Sanchez, E.R.** (2002). A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J.Biol.Chem.* **277**, 4597-600.
- de Kloet, E.R., Oitzl, M.S., und Joels, M.** (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* **22**, 422-426.
- de Kloet, E.R. und Reul, J.M.** (1987). Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology* **12**, 83-105.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., und Joels, M.** (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr.Rev.* **19**, 269-301.
- Denny, W.B., Valentine, D.L., Reynolds, P.D., Smith, D.F., und Scammell, J.G.** (2000). Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. *Endocrinology* **141**, 4107-4113.
- Diamond, D.M., Fleshner, M., Ingersoll, N., und Rose, G.M.** (1996). Psychological stress impairs spatial working memory: relevance to electrophysiological studies of hippocampal function. *Behav.Neurosci.* **110**, 661-672.
- Dillon, C. und Goda, Y.** (2005). The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu.Rev.Neurosci.* **28**, 25-55.
- Dittmar, K.D., Banach, M., Galigniana, M.D., und Pratt, W.B.** (1998). The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J.Biol.Chem.* **273**, 7358-7366.
- Dittmar, K.D. und Pratt, W.B.** (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J.Biol.Chem.* **272**, 13047-13054.
- Drouin, J., Sun, Y.L., Chamberland, M., Gauthier, Y., De, L.A., Nemer, M., und Schmidt, T.J.** (1993). Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J.* **12**, 145-156.

- Duina, A.A., Chang, H.C., Marsh, J.A., Lindquist, S., und Gaber, R.F.** (1996). A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science* **274**, 1713-1715.
- Edwards, R.A. und Bryan, J.** (1995). Fascins, a family of actin bundling proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* **32**, 1-9.
- Evans, D.L., Charney, D.S., Lewis, L., Golden, R.N., Gorman, J.M., Krishnan, K.R., Nemeroff, C.B., Bremner, J.D., Carney, R.M., Coyne, J.C., DeLong, M.R., Frasare-Smith, N., Glassman, A.H., Gold, P.W., Grant, I., Gwyther, L., Ironson, G., Johnson, R.L., Kanner, A.M., Katon, W.J., Kaufmann, P.G., Keefe, F.J., Ketter, T., Laughren, T.P., Leserman, J., Lyketsos, C.G., McDonald, W.M., McEwen, B.S., Miller, A.H., Musselman, D., O'Connor, C., Petitto, J.M., Pollock, B.G., Robinson, R.G., Roose, S.P., Rowland, J., Sheline, Y., Sheps, D.S., Simon, G., Spiegel, D., Stunkard, A., Sunderland, T., Tibbits, P., Jr., und Valvo, W.J.** (2005). Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol. Psychiatry* **58**, 175-189.
- Evans, R.M.** (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895.
- Fan, M., Park, A., und Nephew, K.P.** (2005). CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) promotes basal and geldanamycin-induced degradation of estrogen receptor- α . *Mol. Endocrinol.* **19**, 2901-2914.
- Fejes-Toth, G., Pearce, D., und Naray-Fejes-Toth, A.** (1998). Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: Effects of receptor agonists and antagonists. *PNAS* **95**, 2973-2978.
- Fliss, A.E., Benzeno, S., Rao, J., und Caplan, A.J.** (2000). Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **72**, 223-230.
- Freeman, B.C., Felts, S.J., Toft, D.O., und Yamamoto, K.R.** (2000). The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies. *Genes Dev.* **14**, 422-434.
- Freeman, B.C. und Yamamoto, K.R.** (2002). Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science* **296**, 2232-2235.
- Froidevaux, M.S., Berg, P., Seugnet, I., Decherf, S., Becker, N., Sachs, L.M., Bilesimo, P., Nygard, M., Pongratz, I., und Demeneix, B.A.** (2006). The co-chaperone XAP2 is required for activation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone transcription in vivo. *EMBO Rep.* **7**, 1035-1039.
- Fuchs, E., Uno, H., und Flugge, G.** (1995). Chronic psychosocial stress induces morphological alterations in hippocampal pyramidal neurons of the tree shrew. *Brain Res.* **673**, 275-282.

- Galigniana, M.D., Harrell, J.M., Murphy, P.J., Chinkers, M., Radanyi, C., Renoir, J.M., Zhang, M., und Pratt, W.B.** (2002). Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry* **41**, 13602-13610.
- Galigniana, M.D., Scruggs, J.L., Herrington, J., Welsh, M.J., Carter-Su, C., Housley, P.R., und Pratt, W.B.** (1998). Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Mol.Endocrinol.* **12**, 1903-1913.
- Gee, A.C. und Katzenellenbogen, J.A.** (2001). Probing conformational changes in the estrogen receptor: evidence for a partially unfolded intermediate facilitating ligand binding and release. *Mol.Endocrinol.* **15**, 421-428.
- Giguère, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., und Evans, R.M.** (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **46**, 645-652.
- Gomez-Sanchez, E.P.** (1997). Central hypertensive effects of aldosterone. *Front Neuroendocrinol.* **18**, 440-462.
- Gourlay, C.W. und Ayscough, K.R.** (2005). The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 583-589.
- Gourlay, C.W., Carpp, L.N., Timpson, P., Winder, S.J., und Ayscough, K.R.** (2004). A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. *J.Cell Biol.* **164**, 803-809.
- Grenert, J.P., Sullivan, W.P., Fadden, P., Haystead, T.J., Clark, J., Mimnaugh, E., Krutzsch, H., Ochel, H.J., Schulte, T.W., Sausville, E., Neckers, L.M., und Toft, D.O.** (1997). The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J.Biol.Chem.* **272**, 23843-23850.
- Hammes, A., Andreassen, T.K., Spoelgen, R., Raila, J., Hubner, N., Schulz, H., Metzger, J., Schweigert, F.J., Luppa, P.B., Nykjaer, A., und Willnow, T.E.** (2005). Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* **122**, 751-762.
- Hartl, F.U. und Hayer-Hartl, M.** (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852-1858.
- He, B., Bai, S.X., Hnat, A.T., Kalman, R.I., Minges, J.T., Patterson, C., und Wilson, E.M.** (2004). An androgen receptor NH2-terminal conserved motif interacts with the COOH terminus of the Hsp70-interacting protein (CHIP) 10.1074/jbc.M403117200. *J.Biol.Chem.* **279**, 30643-30653.
- Hebb, D.O.** (1949). *The organization of behaviour- a neuropsychological theory*, John Wiley & Sons (New York)
- Heine, V.M., Maslam, S., Zareno, J., Joels, M., und Lucassen, P.J.** (2004). Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur.J.Neurosci.* **19**, 131-144.

- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., und Cullinan, W.E.** (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* **24**, 151-180.
- Hoffmann, K. und Handschumacher, R.E.** (1995). Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90. *Biochem.J.* **307 (Pt 1)**, 5-8.
- Holsboer, F.** (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* **23**, 477-501.
- Hubler, T.R., Denny, W.B., Valentine, D.L., Cheung-Flynn, J., Smith, D.F., und Scammell, J.G.** (2003). The FK506-Binding Immunophilin FKBP51 Is Transcriptionally Regulated by Progesterone and Attenuates Progesterone Responsiveness. *Endocrinology* **144**, 2380-2387.
- Ikeda, K., Ogawa, S., Tsukui, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kato, S., Muramatsu, M., und Inoue, S.** (2004). Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol.Endocrinol.* **18**, 1131-43.
- Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D., und Toft, D.O.** (1998). Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J.Biol.Chem.* **273**, 3679-3686.
- Kang, H., Sayner, S.L., Gross, K.L., Russell, L.C., und Chinkers, M.** (2001). Identification of Amino Acids in the Tetratricopeptide Repeat and C-Terminal Domains of Protein Phosphatase 5 Involved in Autoinhibition and Lipid Activation. *Biochemistry* **40**, 10485-10490.
- Karst, H. und Joels, M.** (1991). The induction of corticosteroid actions on membrane properties of hippocampal CA1 neurons requires protein synthesis. *Neurosci.Lett.* **130**, 27-31.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., und Pongratz, I.** (2000). The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J.Biol.Chem.* **275**, 41317-41324.
- Kerr, D.S., Campbell, L.W., Thibault, O., und Landfield, P.W.** (1992). Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent Ca²⁺ conductances: relevance to brain aging. *PNAS* **89**, 8527-8531.
- Kholodnyuk, I.D., Kozireva, S., Kost-Alimova, M., Kashuba, V., Klein, G., und Imreh, S.** (2006). Down regulation of 3p genes, LTF, SLC38A3 and DRR1, upon growth of human chromosome 3-mouse fibrosarcoma hybrids in severe combined immunodeficiency mice. *Int.J.Cancer* **119**, 99-107.
- Kim, J.J. und Diamond, D.M.** (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience* **3**, 453-462.
- Klinke, R. und Silbernagl, S.** (1994). *Lehrbuch der Physiologie*, Georg Thieme Verlag (Stuttgart)

- Kosano, H., Stensgard, B., Charlesworth, M.C., McMahon, N., und Toft, D.** (1998). The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. *J.Biol.Chem.* **273**, 32973-32979.
- Kovacs, K.J. und Sawchenko, P.E.** (1996). Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. *J.Mol.Neurosci.* **7**, 125-133.
- Kurita, S., Gunji, E., Ohashi, K., und Mizuno, K.** (2007). Actin filaments-stabilizing and -bundling activities of cofilin-phosphatase Slingshot-1. *Genes Cells* **12**, 663-676.
- Laenger, A., Lang-Rollin, I., Kozany, C., Zschocke, J., Zimmermann, N., Ruegg, J., Holsboer, F., Hausch, F., und Rein, T.** (2009). XAP2 inhibits glucocorticoid receptor activity in mammalian cells. *FEBS Lett.* **583**, 1493-1498.
- Lekman, M., Laje, G., Charney, D., Rush, A.J., Wilson, A.F., Sorant, A.J., Lipsky, R., Wisniewski, S.R., Manji, H., McMahon, F.J., und Paddock, S.** (2008). The FKBP5-gene in depression and treatment response--an association study in the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR*D) Cohort. *Biol.Psychiatry* **63**, 1103-1110.
- Levine, S.** (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiol Behav.* **73**, 255-260.
- Liebl, C., Panhuysen, M., Putz, B., Trumbach, D., Wurst, W., Deussing, J.M., Muller, M.B., und Schmidt, M.V.** (2009). Gene expression profiling following maternal deprivation: involvement of the brain Renin-Angiotensin system. *Front Mol.Neurosci.* **2**, 1.
- Lightman, S.L.** (2008). The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J.Neuroendocrinol.* **20**, 880-884.
- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R., und Buchner, J.** (1993). Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Protein Sci.* **2**, 1490-1496.
- Liu, F. und Khawaja, X.** (2005). Basal adrenocorticotropin (ACTH) secretion is negatively modulated by protein phosphatase 5 in mouse pituitary corticotropin AtT20 cells. *Regul.Pept.* **127**, 191-6.
- Lombes, M., Binart, N., Delahaye, F., Baulieu, E.E., und Rafestin-Oblin, M.E.** (1994). Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *Biochem.J.* **302 (Pt 1)**, 191-197.
- Lupien, S.J., Maheu, F., Tu, M., Fiocco, A., und Schramek, T.E.** (2007). The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn.* **65**, 209-237.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., und Heim, C.** (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience* **10**, 434-445.

- Ma, Q. und Whitlock, J.P., Jr.** (1997). A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J.Biol.Chem.* **272**, 8878-8884.
- Malkoski, S.P. und Dorin, R.I.** (1999). Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol.Endocrinol.* **13**, 1629-1644.
- Malkoski, S.P., Handanos, C.M., und Dorin, R.I.** (1997). Localization of a negative glucocorticoid response element of the human corticotropin releasing hormone gene. *Mol.Cell Endocrinol.* **127**, 189-199.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., und Chambon, P.** (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.
- McEwen, B.S.** (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol.Rev.* **87**, 873-904.
- McEwen, B.S., de Kloet, E.R., und Rostene, W.** (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol.Rev.* **66**, 1121-1188.
- McLaughlin, S.H., Smith, H.W., und Jackson, S.E.** (2002). Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. *J.Mol.Biol.* **315**, 787-798.
- Meijsing, S.H., Pufall, M.A., So, A.Y., Bates, D.L., Chen, L., und Yamamoto, K.R.** (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* **324**, 407-410.
- Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P., und Perdew, G.H.** (1998). Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol.Cell Biol.* **18**, 978-988.
- Miklos, I.H. und Kovacs, K.J.** (2002). GABAergic innervation of corticotropin-releasing hormone (CRH)-secreting parvocellular neurons and its plasticity as demonstrated by quantitative immunoelectron microscopy. *Neuroscience* **113**, 581-592.
- Miller, C.A.** (2002). Two tetratricopeptide repeat proteins facilitate human aryl hydrocarbon receptor signalling in yeast. *Cell Signal.* **14**, 615-623.
- Moffatt, N.S., Bruinsma, E., Uhl, C., Obermann, W.M., und Toft, D.** (2008). Role of the cochaperone Tpr2 in Hsp90 chaperoning. *Biochemistry* **47**, 8203-8213.
- Morishima, Y., Kanelakis, K.C., Silverstein, A.M., Dittmar, K.D., Estrada, L., und Pratt, W.B.** (2000). The Hsp Organizer Protein Hop Enhances the Rate of but Is Not Essential for Glucocorticoid Receptor Folding by the Multiprotein Hsp90-based Chaperone System. *J.Biol.Chem.* **275**, 6894-6900.

- Nemeroff, C.B. und Owens, M.J.** (2002). Treatment of mood disorders. *Nat.Neurosci.* **5** Suppl, 1068-1070.
- Ng, P.C.** (2000). The fetal and neonatal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal.Ed.* **82**, F250-F254.
- Nishi, M., Ogawa, H., Ito, T., Matsuda, K.I., und Kawata, M.** (2001). Dynamic changes in subcellular localization of mineralocorticoid receptor in living cells: in comparison with glucocorticoid receptor using dual-color labeling with green fluorescent protein spectral variants. *Mol.Endocrinol.* **15**, 1077-1092.
- Oitzl, M.S., Workel, J.O., Fluttert, M., Frosch, F., und de Kloet, E.R.** (2000). Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats. *Eur.J.Neurosci.* **12**, 3771-3780.
- Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A., und Hayashi, Y.** (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat.Neurosci.* **7**, 1104-1112.
- Owens, M.J. und Nemeroff, C.B.** (1993). The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. *Ciba Found.Symp.* **172**, 296-308.
- Owens-Grillo, J.K., Czar, M.J., Hutchison, K.A., Hoffmann, K., Perdew, G.H., und Pratt, W.B.** (1996). A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *J.Biol.Chem.* **271**, 13468-13475.
- Parker, K.J., Schatzberg, A.F., und Lyons, D.M.** (2003). Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm.Behav.* **43**, 60-66.
- Parnass, Z., Tashiro, A., und Yuste, R.** (2000). Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* **10**, 561-568.
- Patel, P.D., Lopez, J.F., Lyons, D.M., Burke, S., Wallace, M., und Schatzberg, A.F.** (2000). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *J.Psychiatr.Res.* **34**, 383-392.
- Pearl, L.H. und Prodromou, C.** (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu.Rev.Biochem.* **75**, 271-294.
- Petersen, H.H., Andreassen, T.K., Breiderhoff, T., Brasen, J.H., Schulz, H., Gross, V., Grone, H.-J., Nykjaer, A., und Willnow, T.E.** (2006). Hyporesponsiveness to Glucocorticoids in Mice Genetically Deficient for the Corticosteroid Binding Globulin. *Mol.Cell.Biol.* **26**, 7236-7245.
- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S., und Yamamoto, K.R.** (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* **348**, 166-168.

- Pirkel, F. und Buchner, J.** (2001). Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J.Mol.Biol.* **308**, 795-806.
- Pratt, W.B. und Toft, D.O.** (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr.Rev.* **18**, 306-360.
- Pratt, W.B. und Toft, D.O.** (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* **228**, 111-133.
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W., und Pearl, L.H.** (1999). Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)- domain co-chaperones. *EMBO J.* **18**, 754-762.
- Radley, J.J., Rocher, A.B., Rodriguez, A., Ehlenberger, D.B., Dammann, M., McEwen, B.S., Morrison, J.H., Wearne, S.L., und Hof, P.R.** (2008). Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J.Comp.Neurol.* **507**, 1141-1150.
- Radoja, N., Komine, M., Jho, S.H., Blumenberg, M., und Tomic-Canic, M.** (2000). Novel mechanism of steroid action in skin through glucocorticoid receptor monomers. *Mol.Cell.Biol.* **20**, 4328-4339.
- Reul, J.M. und de Kloet, E.R.** (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* **117**, 2505-2511.
- Richter, K., Muschler, P., Hainzl, O., Reinstein, J., und Buchner, J.** (2003). Sti1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the atpase cycle. *J.Biol.Chem.* **278**, 10328-10333.
- Riggs, D.L., Roberts, P.J., Chirillo, S.C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T., Gaber, R., Picard, D., und Smith, D.F.** (2003). The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J.* **22**, 1158-67.
- Riggs, D.L., Cox, M.B., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Carrigan, P.E., und Smith, D.F.** (2004). Functional Specificity of Co-Chaperone Interactions with Hsp90 Client Proteins. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* **39**, 279-295.
- Riggs, D.L., Cox, M.B., Tardif, H.L., Hessling, M., Buchner, J., und Smith, D.F.** (2007). Noncatalytic Role of the FKBP52 Peptidyl-Prolyl Isomerase Domain in the Regulation of Steroid Hormone Signaling. *Mol.Cell.Biol.* **27**, 8658-8669.
- Rossie, S., Jayachandran, H., und Meisel, R.L.** (2006). Cellular co-localization of protein phosphatase 5 and glucocorticoid receptors in rat brain. *Brain Res.* **1111**, 1-11.
- Rost, B., Yachdav, G., und Liu, J.** (2004). The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res.* **32**, W321-W326.

- Russell, L.C., Whitt, S.R., Chen, M.S., und Chinkers, M.** (1999). Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *J.Biol.Chem.* **274**, 20060-3.
- Sandi, C., Loscertales, M., und Guaza, C.** (1997). Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur.J.Neurosci.* **9**, 637-642.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., und Hen, R.** (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**, 805-809.
- Sasaki, Y., Hayashi, K., Shirao, T., Ishikawa, R., und Kohama, K.** (1996). Inhibition by drebrin of the actin-bundling activity of brain fascin, a protein localized in filopodia of growth cones. *J.Neurochem.* **66**, 980-988.
- Scammell, J.G., Denny, W.B., Valentine, D.L., und Smith, D.F.** (2001). Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates. *Gen.Comp.Endocrinol.* **124**, 152-165.
- Schäufele, F., Carbonell, X., Guerbodot, M., Borngraeber, S., Chapman, M.S., Ma, A.A., Miner, J.N., und Diamond, M.I.** (2005). The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *PNAS* **102**, 9802-9807.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., und Moarefi, I.** (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199-210.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., van, D.L., Mol, C.A., und Borst, P.** (1995). Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J.Clin.Invest* **96**, 1698-1705.
- Schmidt, M., Enthoven, L., van Woezik, J.H., Levine, S., de Kloet, E.R., und Oitzl, M.S.** (2004). The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J.Neuroendocrinol.* **16**, 52-57.
- Shao, L. und Vawter, M.P.** (2008). Shared gene expression alterations in schizophrenia and bipolar disorder. *Biol.Psychiatry* **64**, 89-97.
- Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Kanelakis, K.C., Radanyi, C., Renoir, J.M., und Pratt, W.B.** (1999). Different Regions of the Immunophilin FKBP52 Determine Its Association with the Glucocorticoid Receptor, hsp90, and Cytoplasmic Dynein. *J.Biol.Chem.* **274**, 36980-36986.
- Smith, D.F.** (1998). Sequence motifs shared between chaperone components participating in the assembly of progesterone receptor complexes. *Biol.Chem.* **379**, 283-288.

- Somers, J.P. und DeFranco, D.B.** (1992). Effects of okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, on glucocorticoid receptor-mediated enhancement. *Mol.Endocrinol.* **6**, 26-34.
- Sterling, P. and Eyer, J.** (1988). Allostasis: A New Paradigm to Explain Arousal Pathology. *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*, John Wiley & Sons (New York)
- Strähle, U., Klock, G., und Schutz, G.** (1987). A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *PNAS* **84**, 7871-7875.
- Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K.A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M.P., Walker, J.R., und Hogenesch, J.B.** (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 6062-6067.
- Sullivan, W., Stensgard, B., Caucutt, G., Bartha, B., McMahon, N., Alnemri, E.S., Litwack, G., und Toft, D.** (1997). Nucleotides and two functional states of hsp90. *J.Biol.Chem.* **272**, 8007-8012.
- Sumanasekera, W.K., Tien, E.S., Davis, J.W., Turpey, R., Perdew, G.H., und Vanden Heuvel, J.P.** (2003). Heat shock protein-90 (Hsp90) acts as a repressor of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPARbeta activity. *Biochemistry* **42**, 10726-10735.
- Swingle, M.R., Honkanen, R.E., und Ciszak, E.M.** (2004). Structural basis for the catalytic activity of human serine/threonine protein phosphatase-5. *J.Biol.Chem.* **279**, 33992-9.
- Takumi, Y., Ramirez-Leon, V., Laake, P., Rinvik, E., und Ottersen, O.P.** (1999). Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat.Neurosci.* **2**, 618-624.
- Tranguch, S., Cheung-Flynn, J., Daikoku, T., Prapapanich, V., Cox, M.B., Xie, H., Wang, H., Das, S.K., Smith, D.F., und Dey, S.K.** (2005). Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *PNAS* **102**, 14326-14331.
- Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Haché, R.J., und Beato, M.** (1995). Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J.* **14**, 1737-1751.
- Tsai, M.J. und O'Malley, B.W.** (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu.Rev.Biochem.* **63:451-86.**, 451-486.
- Uhr, M., Tontsch, A., Namendorf, C., Ripke, S., Lucae, S., Ising, M., Dose, T., Ebinger, M., Rosenhagen, M., Kohli, M., Kloiber, S., Salyakina, D., Bettecken, T., Specht, M., Putz, B., Binder, E.B., Muller-Myhsok, B., und Holsboer, F.** (2008). Polymorphisms in the Drug Transporter Gene ABCB1 Predict Antidepressant Treatment Response in Depression. *Neuron* **57**, 203-209.

- van den Boom, J., Wolter, M., Blaschke, B., Knobbe, C.B., und Reifenberger, G.** (2006). Identification of novel genes associated with astrocytoma progression using suppression subtractive hybridization and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Int.J.Cancer* **119**, 2330-2338.
- Viau, V.** (2002). Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J.Neuroendocrinol.* **14**, 506-513.
- Videbech, P. und Ravnkilde, B.** (2004). Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am.J.Psychiatry* **161**, 1957-1966.
- Vignjevic, D., Kojima, S., Aratyn, Y., Danciu, O., Svitkina, T., und Borisy, G.G.** (2006). Role of fascin in filopodial protrusion. *J.Cell Biol.* **174**, 863-875.
- Wandinger, S.K., Suhre, M.H., Wegele, H., und Buchner, J.** (2006). The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J.* **25**, 367-76.
- Wang, L., Darling, J., Zhang, J.S., Liu, W., Qian, J., Bostwick, D., Hartmann, L., Jenkins, R., Bardenhauer, W., Schutte, J., Opalka, B., und Smith, D.I.** (2000). Loss of expression of the DRR 1 gene at chromosomal segment 3p21.1 in renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **27**, 1-10.
- Wang, Z., Chen, W., Kono, E., Dang, T., und Garabedian, M.J.** (2007). Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Mol.Endocrinol.* **21**, 625-634.
- Warth, R., Briand, P.A., und Picard, D.** (1997). Functional analysis of the yeast 40 kDa cyclophilin Cyp40 and its role for viability and steroid receptor regulation. *Biol.Chem.* **378**, 381-391.
- Webster, J.I., Tonelli, L., und Sternberg, E.M.** (2002). Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu.Rev.Immunol.* **20**, 125-163.
- Willour, V.L., Chen, H., Toolan, J., Belmonte, P., Cutler, D.J., Goes, F.S., Zandi, P.P., Lee, R.S., MacKinnon, D.F., Mondimore, F.M., Schweizer, B., DePaulo, J.R., Jr., Gershon, E.S., McMahon, F.J., und Potash, J.B.** (2008). Family-based association of FKBP5 in bipolar disorder. *Mol.Psychiatry* **14**, 261-268.
- Wohnik, G.M., Ruegg, J., Abel, G.A., Schmidt, U., Holsboer, F., und Rein, T.** (2005). FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* **280**, 4609-16.
- Wohnik, G.M., Young, J.C., Schmidt, U., Holsboer, F., Hartl, F.U., und Rein, T.** (2004). Inhibition of GR-mediated transcription by p23 requires interaction with Hsp90. *FEBS Lett.* **560**, 35-38.
- Wylie, S.R. und Chantler, P.D.** (2003). Myosin IIA drives neurite retraction. *Mol.Biol.Cell* **14**, 4654-4666.

- Yamato, T., Orikasa, K., Fukushige, S., Orikasa, S., und Horii, A.** (1999). Isolation and characterization of the novel gene, TU3A, in a commonly deleted region on 3p14.3-->p14.2 in renal cell carcinoma. *Cytogenet. Cell Genet.* **87**, 291-295.
- Yang, Z., Wolf, I.M., Chen, H., Periyasamy, S., Chen, Z., Yong, W., Shi, S., Zhao, W., Xu, J., Srivastava, A., Sanchez, E.R., und Shou, W.** (2006). FK506-binding protein 52 is essential to uterine reproductive physiology controlled by the progesterone receptor A isoform. *Mol. Endocrinol.* **20**, 2682-2694.
- Yehuda, R.** (2002). Post-traumatic stress disorder. *N. Engl. J. Med.* **346**, 108-114.
- Yong, W., Yang, Z., Periyasamy, S., Chen, H., Yucel, S., Li, W., Lin, L.Y., Wolf, I.M., Cohn, M.J., Baskin, L.S., Sanchez, E.R., und Shou, W.** (2007). Essential Role for Co-chaperone Fkbp52 but Not Fkbp51 in Androgen Receptor-mediated Signaling and Physiology. *J. Biol. Chem.* **282**, 5026-5036.
- Yuste, R. und Bonhoeffer, T.** (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 24-34.
- Zhao, X.-Y., Liang, S.-F., Yao, S.-H., Ma, F.-X., Hu, Z.-G., Yan, F., Yuan, Z., Ruan, X.-Z., Yang, H.-S., Zhou, Q., und Wei, Y.-Q.** (2007). Identification and preliminary function study of *Xenopus laevis* DRR1 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **361**, 74-78.
- Zhou, G., Golden, T., Aragon, I.V., und Honkanen, R.E.** (2004). Ser/Thr Protein Phosphatase 5 Inactivates Hypoxia-induced Activation of an Apoptosis Signal-regulating Kinase 1/MKK-4/JNK Signaling Cascade. *J. Biol. Chem.* **279**, 46595-46605.
- Zuo, Z., Urban, G., Scammell, J.G., Dean, N.M., McLean, T.K., Aragon, I., und Honkanen, R.E.** (1999). Ser/Thr Protein Phosphatase Type 5 (PP5) Is a Negative Regulator of Glucocorticoid Receptor-Mediated Growth Arrest. *Biochemistry* **38**, 8849-8857.

8 Abkürzungen

ACTH	adrenocorticotropines Hormon
AF	Aktivierungsfunktion
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
AR	Androgenrezeptor
CBG	Corticosteroid bindendes Globulin
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
Cyp	Cyclophilin
DBD	DNA-Bindungsdomäne
Dex	Dexamethason
DHT	Dihydrotestosteron
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DRR1	<i>engl.</i> : downregulated in renal cell carcinoma 1
E.coli	Escherichia coli
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
ER	Östrogenrezeptor <i>engl.</i> : Estrogenreceptor
ERE	estrogenresponsives Element
EtOH	Ethanol
FAB	<i>engl.</i> F-Actin buffer
FBS	<i>engl.</i> fetal bovine serum
FKBP	FK506 Binding Protein
GAB	<i>engl.</i> : G-Actin buffer
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	glucocorticoidresponsives Element
h	Stunde
HA-Tag	Hemagglutinin-Tag
HIP	Hippocampus
HIS	Histidin-Tag
Hop	Hsp-organisierendes-Protein
HPA-Achse	<i>engl.</i> : hypothalamic-pituitary-adrenal axis
HRE	hormonresponsives Element

HS	<i>engl.</i> : horse serum
Hsp	Hitzeschockprotein
HYP	Hypophyse
IB	Immunoblot
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LSM	<i>engl.</i> : laser scanning microscope
LTP	<i>engl.</i> : long term potentiation
MBP	Maltose bindendes Protein
MCS	Multiple cloning site
min	Minute
MMTV	<i>engl.</i> : mouse mammary tumor virus
MR	Mineralocorticoidrezeptor
NBA	Neurobasal A
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
OD	optische Dichte
PBS	<i>engl.</i> : phosphate buffered saline
PP5	Proteinphosphatase 5
PPIase	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
PR	Progesteronrezeptor
PVN	Nukleus paraventricularis
RT	Raumtemperatur
SBG	steroidbindendes Globulin
SDS	<i>engl.</i> : sodium dodecylsulfate
sek	Sekunde
SR	Steroidhormonrezeptor
TBS	<i>engl.</i> : tris buffered saline
TM	<i>engl.</i> : target modulator
TPR	Tetratricopeptidrepeat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TU3A	Tohoku University cDNA clone A on Chromosome 3
U	Einheit (<i>engl.</i> Unit)
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Name: Jan-Philip Schülke
Geburtsdatum: 29. Juni 1978
Geburtsort: Mülheim an der Ruhr
Nationalität: Deutsch
Familienstand: Ledig

Ausbildung:

- 07/2005 - 12/2009 Dissertation am Max-Planck-Institut für Psychiatrie unter der Betreuung von Prof. Florian Holsboer. Thema: „Regulation von Steroidhormonrezeptoren und ihre physiologischen Wirkungen am Beispiel eines durch Stress regulierten Proteins“
- 09/1999 - 01/2005 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Hauptfach: Biochemie
1. Nebenfach: Zell- und Entwicklungsbiologie
2. Nebenfach: Mikrobiologie
- 04/2004-01/2005 Diplomarbeit am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg. Thema: „Strategien zur Evaluierung Schwamm assoziierter mikrobieller Konsortien für die Wirkstoffgewinnung“
- 1989 - 1998 Besuch des Gymnasiums Luisenschule in Mülheim an der Ruhr, Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst:

- 07/1998 - 06/1999 Individuellen Schwerstbehindertenbetreuung bei der *Lebenshilfe* Mülheim an der Ruhr
