

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

Charakterisierung neuronaler Effekte von FKBP51

von

Alexander Christoph Ulrich Kirschner

aus

Langen, Deutschland

2013

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Christoph Turck von der Fakultät für Chemie und Pharmazie betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 14.05.2013

.....
(Unterschrift des Autors / der Autorin)

Dissertation eingereicht am 06.06.2013

1. Gutachter: Prof. Christoph Turck

2. Gutachter: Prof. Roland Beckmann

Mündliche Prüfung am 22.07.2013

für Adi

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Dr. Felix Hausch bedanken, der mir die Ausarbeitung meiner Doktorarbeit in seiner Forschungsgruppe ermöglichte. Seine hohe fachliche Kompetenz und seine stete Diskussionsbereitschaft in Bezug auf wissenschaftliche Problemstellungen haben mich maßgeblich dabei unterstützt, mein wissenschaftliches Niveau zu erreichen.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer, der mir die Möglichkeit bot, die vorliegende Arbeit an solch einem renommierten Institut wie dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie umzusetzen. Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Prof. Christoph Turck und Prof. Roland Beckmann für Ihre Bereitschaft bedanken, als Gutachter meiner Dissertation zu fungieren. Weiter danke ich Prof. Klaus Förstemann, Prof. Ulrike Gaul, und Prof. Dietmar Martin dafür, dass sie sich bereit erklärt haben, als Prüfer meiner Verteidigung zur Verfügung zu stehen.

Ich bedanke mich bei all meinen Kollegen für das – durchaus nicht selbstverständliche – unglaublich angenehme Arbeitsklima, die Momente des gegenseitigen wissenschaftlichen Austauschs und vor allem auch die Zeit, die wir nicht nur innerhalb, sondern auch außerhalb des Labors gemeinsam verbracht haben. Besonderer Dank gilt hier Dr. Steffen Gaali, mit dessen Hilfe diese Arbeit sich erst zu dem entwickelte, was sie nun ist. Weiter bedanke ich mich herzlichst bei Dr. Christian Kozany, der sich nie dagegen verwehrt, sein enormes wissenschaftliches Wissen mit anderen Mitgliedern der Gruppe und des Instituts zu teilen und mir somit bei der Lösung des einen oder anderen Problems sehr geholfen hat.

Ich danke meinem ehemaligen Mitbewohner Dr. David Wilcke für all die gemeinsamen Erlebnisse, die gegenseitigen geistigen Inspirationen, die mich stets in meinem Wirken bestärkt haben und die mich niemals die Zeit unserer Promotionen vergessen lassen werden.

Weiteren Dank richte ich an die Forschungsgruppen von Dr. Osborne Almeida und Dr. Damian Refojo, die mich bei der Entwicklung der in dieser Arbeit umgesetzten Assays maßgeblich unterstützt haben. Vor allem Dr. Paula Fernandez-Vizarra und Dr. Annette Vogl haben in diesem Bereich großes Engagement gezeigt, wofür ich mich bedanken möchte.

Äußerst großer Dank gilt meiner zukünftigen Frau Alexandra für ihre nie endende Unterstützung, ohne die ich niemals in der Lage gewesen wäre, meinen Traum zu verwirklichen. Auch danke ich meiner Mutter und meiner Schwester, die stets für mich da waren und schon von Kindesbeinen an unterstützt und so maßgeblich zu dem gemacht haben, was ich heute bin.

Mein allergrößter Dank gilt meinem viel zu früh verstorbenen Vater, der mich wohl wie kein anderer fortwährend unterstützt und ermutigt hat, den mir so wichtig gewordenen naturwissenschaftlichen Weg zu gehen und auch bei kleineren Problemen beizubehalten. Er war immer Quell meiner wissenschaftlichen Inspiration und wird es wohl auch immer bleiben...

Abstract

Co-chaperones of the heat shock protein 90 are known to modulate the activity of steroid hormone receptors. The FK506-binding proteins 51 and 52 (FKBP51 and FKBP52) modulate transcriptional glucocorticoid and mineralocorticoid receptor-activity in an antagonistic manner. FKBP51 has attracted great attention due to its genetic polymorphisms and gene expression levels, which have been associated with different stress-related phenotypes. These findings support an important role of FKBP51 in psychiatric and stress-related diseases like major depression or post-traumatic stress disorder. However, the exact biochemical mechanisms of how TPR-proteins like FKBP51 act on steroid hormone receptor activities and how these proteins can cause pathophysiological malfunctions of cells remains unknown.

Both FKBP51 as well as FKBP52 are able to modulate the outgrowth of neurites in neuroblastoma cells (N2a). Upon differentiation FKBP51 was reported to decrease the elongation of neurites, while FKBP52 enhances neurite development. It is unknown how co-chaperones influence the outgrowth behavior of neurons. In particular it is not clear if and to which extent steroid hormone receptors are involved in those mechanisms.

In this work we used different approaches to elucidate the molecular mechanism of how FKBP5s regulate this important developmental process. First, using selective agonists and antagonists for the glucocorticoid receptor as well as for the mineralocorticoid receptor we showed that these receptors can influence neurite outgrowth and mediate at least in part the effects of FKBP51. Second, we tested different FKBP isoforms as well as different FKBP mutants to map and specify important protein domains. Third, we investigated the function of these co-chaperones by specifically inhibiting them. Since all FKBP ligands reported so far are unspecific for FKBP5s we used a chemical genomic tool to specifically inhibit overexpressed FKBP51 or FKBP52 mutants. Using this system we were able to show the first time that the modulating effects of both proteins were pharmacologically reversible and that simultaneous inhibition of FKBP51 and FKBP52 can cancel the effects of each other. Fourth, we tested the role of endogenous wildtype FKBP51 on neuritogenesis using the first FKBP51-selective inhibitors. We were able to demonstrate that selective inhibition of FKBP51 enhances neurite outgrowth in a dose-dependent manner significantly stronger compared to unselective ligands like FK506. Fifth, we showed that an inhibition of FKBP51 can block neurite outgrowth-suppressing effects of high concentrations of steroids. This suggests that FKBP51 can also be a downstream effector of GR or MR in addition to its GR or MR inhibiting function.

This work exemplifies the important effects of FKBP51 on neuronal differentiation and demonstrates for the first time that specific inhibition of FKBP51 in neuroblastoma cells as well as in primary neurons leads to enhanced differentiation, a key step for the development and adaptation of neuronal circuits.

Zusammenfassung

Co-Chaperone des Hitzeschockproteins 90 sind in der Lage, die Aktivität von Steroidhormonrezeptoren zu regulieren. Die FK506-bindenden Proteine 51 und 52 (FKBP51 und FKBP52) modulieren die transkriptionelle Glucocorticoid- wie auch Mineralcorticoidrezeptor-Aktivität in antagonistischer Weise. Interessanterweise hat FKBP51 in den letzten Jahren vor allem dadurch Aufsehen erregt, dass genetische Polymorphismen und Expressionsspiegel des Proteins bei der Ausbildung von Krankheiten, die auf Stress zurückgehen, von Relevanz sein können. Hierbei handelt es sich um psychische Erkrankungen wie Depressionen oder posttraumatische Belastungsstörungen. Nichtsdestotrotz sind die biochemischen Prinzipien, die beschreiben, wie diese Proteine sowohl die Aktivität von Steroidhormonrezeptoren, aber auch pathologische Fehlfunktionen von Zellen beeinflussen, bislang größtenteils unbekannt.

Sowohl FKBP51 als auch FKBP52 vermögen den Neuritenwuchs von Neuroblastoma-Zellen (N2a) zu regulieren. Bezogen auf diese Differenzierung wurde FKBP51 als inhibierendes und FKBP52 als wachstumstimulierendes Protein beschrieben. Es ist jedoch nicht bekannt, auf welche Weise Co-Chaperone das Verhalten des Neuriten-Wachstums modulieren. Weiter ist ungeklärt, ob und wenn ja, inwieweit Steroidhormonrezeptoren in diesen Prozessen eine Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, die vor allem darauf abzielten, die molekularen Mechanismen der von FKBP51 ausgehenden Modulation solcher wichtigen Entwicklungsprozesse zu entschlüsseln. Zunächst gelang es uns, durch Verwendung selektiver Agonisten wie auch Antagonisten des Glucocorticoidrezeptors und Mineralcorticoidrezeptors zu zeigen, dass beide Rezeptoren den Neuriten-Wuchs beeinflussen und in diesem Prozess zumindest anteilig einen Effekt durch FKBP51 vermitteln. Darüber hinaus testeten wir unterschiedliche FKBP-Isoformen und -Mutanten, um die hierfür relevanten Domänen näher einzugrenzen. Schließlich untersuchten wir durch spezifische Inhibition der Co-Chaperone deren Funktion. Da sämtliche bis dato publizierte Inhibitoren der FKBP51 unselektiv für einzelne FKBP51 sind, nutzten wir ein Werkzeug der chemischen Genomik, um spezifisch entweder überexprimierte FKBP51- oder FKBP52-Mutanten zu inhibieren. Dies ermöglichte uns erstmals zu zeigen, dass die modulativen Effekte beider Proteine pharmakologisch reversibel sind und dass die simultane Inhibition beider FKBP51 gleichzeitig auch die Effekte beider Proteine aufhebt. Des Weiteren untersuchten wir durch Verwendung der ersten FKBP51-selektiven Inhibitoren die Rolle des endogenen Wildtyp FKBP51 auf die Neuritogenese. Hierdurch konnten wir demonstrieren, dass eine selektive Inhibition von FKBP51 in dosisabhängiger Weise das Neuritenwachstum von neuronalen Zellen stärker beeinflussen kann als durch Verwendung unselektiver Liganden wie FK506. Abschließend zeigten wir, dass eine Inhibition von FKBP51 die neuritenwachstumsreduzierende Effekte hoher Steroidkonzentrationen blockieren kann. Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass FKBP51 zusätzlich zu seinen inhibierenden Effekten auf den GR und MR auch als Effektor beider Rezeptoren fungiert.

Diese Arbeit veranschaulicht die überaus wichtigen Effekte von FKBP51 auf die neuronale Entwicklung und demonstriert zum ersten Mal, dass eine spezifische Inhibition von FKBP51 in Neuroblastoma-Zellen wie auch in primären Neuronen zu einer verstärkten Differenzierung führt, welche wiederum einen Schlüsselschritt der Entwicklung und Adaption neuronaler Netzwerke darstellt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die HPA Achse und ihr Einfluss auf Depressionen	1
1.2	Steroidhormonrezeptoren	4
1.3	Immunophiline	9
1.4	Neuronale Effekte von FKBP-Liganden.....	11
1.5	FKBP51 und FKBP52.....	13
1.6	Neurogenese, Synaptogenese und der Effekt von Antidepressiva	16
1.7	Der Effekt von Steroiden auf neuronale Prozesse.....	19
1.8	Neuroblastoma Zelllinien	22
1.9	Ziel der Arbeit	24
2	Material	27
2.1	Chemikalien	27
2.2	Verbrauchsmaterial	30
2.3	Enzyme	31
2.4	Plasmide	32
2.5	Primer	33
2.6	Viren	34
2.7	Geräte.....	35
2.8	Bakterien und eukaryotische Zellkultur	36
2.9	Kits	36
2.10	Software	36
3	Methoden.....	39
3.1	Molekularbiologische Methoden	39
3.1.1.	Präparation kompetenter <i>E. Coli</i> -Bakterien	39
3.1.2.	Transformation.....	39
3.1.3.	Bakterien-Kulturen	39

3.1.4.	Präparation von DNS und deren Quantifizierung.....	40
3.1.5.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	41
3.1.6	Aufreinigung und Analyse von PCR-Produkten	42
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	47
3.2.1	Expression und Aufreinigung von Proteinen.....	47
3.2.2	Analyse aufgereinigter Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50
3.2.3	Bestimmung der Protein Konzentration.....	52
3.3	Zellbiologische Methoden und Assays	56
3.3.1	Neuro-2a und HEK Zellen	56
3.3.2	Radioaktiv-Bindungsassay	59
3.3.3	Primäre Neuronen	63
3.3.4	Immunoblotting.....	66
4	Ergebnisse.....	69
4.1	Der Einfluss von FKBP51 auf das Neuritenwachstum von Neuroblastom-Zellen.....	69
4.2	Bestimmung relevanter Domänen von FKBP51 für die Modulation des Neuritenwachstums	74
4.3	Die Beeinflussung der N2a-Zelldifferenzierung durch eine selektive Inhibition von FKBP51	76
4.4	Die Modulation des Differenzierungsverhaltens von N2a-Zellen durch Steroide	83
4.5	Der Einfluss von FKBP51-Inhibitoren auf die Signaltransduktion von Steroidrezeptoren	91
4.6	Der Einfluss von Immunophilin-Liganden auf das Differenzierungsverhalten von N2a-Zellen	98
4.7	Die Stimulation des Wachstumsverhaltens von N2a-Zellen durchFKBP51 selektive Liganden	101
4.8	Mechanistische Studien zur Stimulation des Neuritenwachstums von N2a-Zellen durch Steroide	105
4.9	Der Einfluss von FKBP51 und Steroiden auf die Neuritogenese von hippocampalen primären Neuronen.....	110

5	Diskussion.....	119
5.1	Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die neuronale Plastizität	119
5.2	Die Modulation neuronaler Differenzierung durch Co-Regulatoren der Steroidhormonrezeptoren	125
5.3	Der Einfluss von Immunophilin-Liganden auf die neuronale Differenzierung	133
6	Literaturverzeichnis.....	143

1 Einleitung

1.1 Die HPA Achse und ihr Einfluss auf Depressionen

In der heutigen Welt wirken verschiedenste Belastungen auf den modernen Menschen ein, die schon als fast selbstverständlich akzeptiert werden. Hierbei wird meist verkannt, dass solche Einflüsse häufig nicht nur temporäre, sondern auch nachhaltige physische wie auch psychische Schädigungen verursachen können. Eine der größten und am häufigsten verbreiteten Belastungen in der westlichen Welt ist Stress. So geben mittlerweile 80 Prozent der deutschen Bevölkerung an, gestresst zu sein [1]. Die alltäglichen Anforderungen an den Menschen können einen so genannten Stressalarm auslösen, der in erster Linie dazu dienen soll, den Körper in Aktionsbereitschaft zu versetzen und auf etwaige Gefahrensituationen vorzubereiten. Wird dieser Stress jedoch chronisch, so kann er zu schweren metabolischen wie auch kardiovaskulären und nicht zuletzt psychischen Krankheiten führen. Dies geht soweit, dass die Weltgesundheitsorganisation WHO Stress sogar als eines der größten Krankheitsrisiken des 21. Jahrhunderts einstuft [2].

Generell wird Stress als körperliche Antwort auf schädigende Reize definiert. Diese unterscheiden sich in physische und psychische Stressoren. Betrachtet man nun die psychischen Belastungen näher, so kann Stress als die Änderung der psychologischen Homöostase definiert werden [3]. Noch genauer betrachtet ist Stress eine auf den Organismus wirkende Belastung, die letztendlich zu einer erhöhten Ausschüttung von Glucocorticoiden führt [4]. Zur Bewältigung dieses Stresses hat sich in Säugetieren ein gut koordiniertes Hormonsystem entwickelt, welches den Hypothalamus, die Hypophyse und die Nebennierenrinde umfasst. Wirkt Stress auf den Organismus ein, so führt dies zuerst zur Produktion von CRH (*coricotropin-releasing hormone*) im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus (PVN) und dies wiederum zur Ausschüttung von ACTH (*adrenocorticotrophes Hormon*) aus der Hypophyse. ACTH gelangt im Anschluss in den Blutkreislauf, wo es in der Nebenniere die Ausschüttung von Glucocorticoiden bewirkt [5]. Die Glucocorticoide selber dienen als Mediatoren des Stressimpulses im Körper, um diesen physiologisch auf besagten Stress einzustellen. Hierbei werden vor allem Systeme zur Energiebereitstellung aktiviert, wie zum Beispiel die Lipolyse und Gluconeogenese [6]. Desweiteren dienen Glucocorticoide als Terminatoren der ausgelösten Hormonkaskade. Sie binden an ihre spezifischen SHRs (Steroidhormon-Rezeptoren) in der Hypophyse, im PVN sowie im Hippocampus. Dadurch werden indirekte Signalwege induziert,

welche unter anderem zur Herabregulierung der mRNA-Expression von CRH und schließlich zur Abschaltung der Hormonkaskade führen [7].

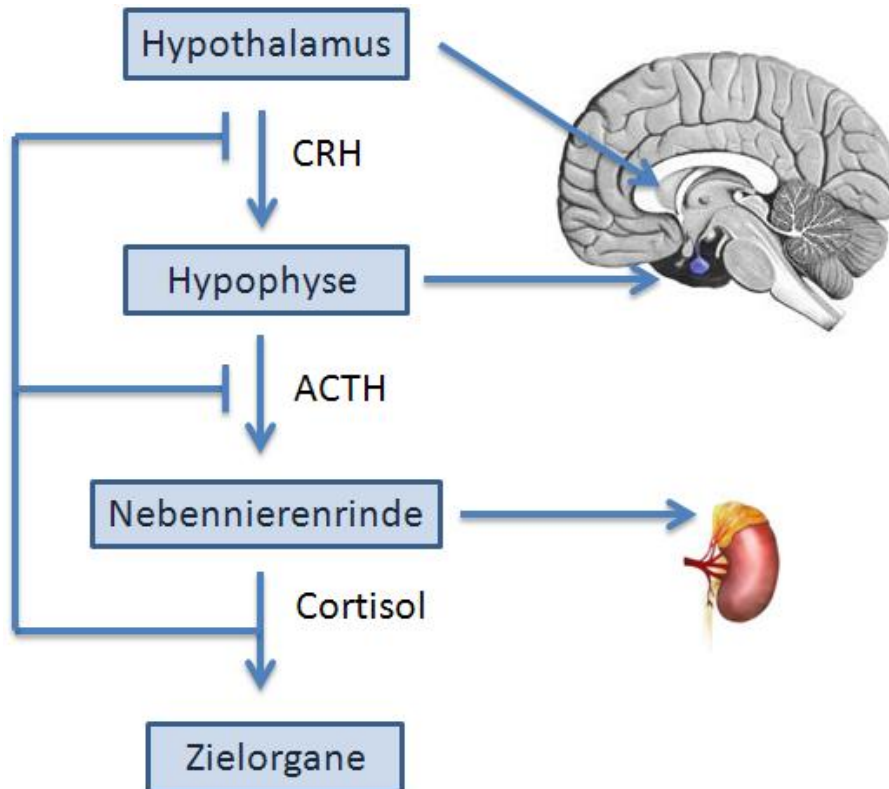


Abbildung 1: Schematische Darstellung der HPA-Achse

Immer mehr Menschen leiden allerdings unter einer fehlregulierten HPA-Achse. Eine der pathologisch bedeutendsten Zustandsveränderungen sind in diesem Fall Depressionen. So zeigten verschiedene Studien, dass bei depressive Störungen erhöhte Konzentrationen von CRH und Glucocorticoiden auftreten [8]. Ein Großteil der depressiven Patienten weisen überdurchschnittlich hohe basale Cortisolspiegel auf, die wiederum auf einer hyperaktiven HPA-Achse beruhen [9]. Um solch einen fehlregulierten Cortisolhaushalt bestimmen zu können, entwickelten Heuser et al. einen kombinierten Dexamethason/CRH-Stresstest [10]. Dabei wird eine geringe Menge des Glucocorticoid-Rezeptor-Agonisten (GR-Agonisten) Dexamethason verabreicht, der durch negative Regulation des Systems die Sekretion von Cortisol herabsetzt. Danach wird zusätzlich CRH gegeben, das wiederum die Ausschüttung von ACTH und weiterem Cortisol zur Folge hat. Bei Patienten, die unter einer fehlerhaften HPA-Achse leiden, hat dies, verglichen mit gesunden Probanden, deutlich höhere ACTH- und Cortisol-Spiegel zur Folge. Dies beweist, dass die negative Rückkopplung des sekretierten Cortisol der Patienten gestört ist (Glucocorticoid-Resistenz). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich bei depressiven Patienten, die nachweislich unter einer gestörten HPA-Achse

litten, nach einer erfolgreichen Behandlung mit Antidepressiva eine Normalisierung der HPA-Aktivität einstellte [11]. Weiter wiesen Zobel et al. nach, dass Patienten, die zwar durch Behandlung mit Antidepressiva eine Verbesserung der psychiatrischen Symptome zeigten, jedoch keine der HPA-Achse, ein deutlich höheres Rückfallrisiko aufweisen als solche, bei denen eine Therapie gleichzeitig zur Besserung der Hormonkaskade führte [12]. Bislang sind die Ursachen, die eine derart dysregulierte HPA-Achse verantworten, noch unzureichend geklärt. Eine der solidesten Hypothesen ist die Corticosteroid-Rezeptor-Hypothese: Hierbei wird konstatiert, dass es sich um eine durch die Steroidhormon-Rezeptoren ausgelöste Fehlregulation handelt [13]. Demnach könnte es sein, dass entweder der GR selbst fehlerhaft ist (zum Beispiel aufgrund von Mutationen) oder das fehlerhafte Chaperone oder Cochaperones des multimeren Steroidhormon-Rezeptor-Komplexes Grund für die pathologischen Zustände sind. Weiter wird in diesem Zusammenhang davon ausgegangen, dass eine Normalisierung der SHR-Signale zu einer Verbesserung der beschriebenen Krankheitsbilder führen können. Somit gilt es als unerlässlich, sowohl die Biochemie der Steroidhormon-Rezeptoren wie auch die seiner Co-Regulatoren genauestens zu verstehen und gegebenenfalls pharmakologisch zu beeinflussen, um Krankheiten, die durch eine Störung der HPA-Achse ausgelöst werden, besser behandeln zu können.

1.2 Steroidhormonrezeptoren

Eine der wichtigsten Hirnregionen im Bezug auf regulatorische Funktionen der HPA-Achse stellt der Hippocampus dar. Hier spielen vor allem Glucocorticoid-Rezeptoren vom Typ I (Mineralcorticoidrezeptor) und Typ II (Glucocorticoidrezeptor) eine dominante Rolle. Beide gehören zu der Klasse der Steroidhormon-Rezeptoren (SHR). Rezeptoren des Typ I haben eine höhere Affinität für zirkulierende Glucocorticoide, jedoch scheinen Rezeptoren vom Typ II einen höheren Einfluss auf den negativen Rückkopplungsmechanismus in Stresssituationen zu haben [14]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei basalen (ungestressten) Cortisol-Spiegeln hauptsächlich der MR aktiviert wird, während eine Erhöhung des zirkulierenden Cortisols eine zusätzliche Aktivierung des GRs bewirkt. SHRs sind intrazelluläre Proteine, deren Domänen bemerkenswert hoch konserviert sind. Bindet ein Ligand an solch einen Rezeptor, so bewirkt dies eine Translokation in den Zellkern, wo der Rezeptor letztendlich als Transkriptionsfaktor agiert. Er ist in der Lage, an für ihn spezifische HREs (*hormone-response elements*) zu binden und die Expression des Zielgens zu modulieren. Im Falle einer Aktivierung wird dann von einer Transaktivierung gesprochen. SHRs sind jedoch auch in der Lage, die Expression des Zielgens zu inhibieren. Dabei bindet der Rezeptor entweder an negative GREs oder agiert mit anderen Transkriptionsfaktoren (Transrepression) [15]. Sämtliche Rezeptoren besitzen eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD), eine DNA-Bindungsdomäne (DBD) und eine darauf folgende variable N-terminale Domäne. Die Ligandenbindungsdomäne aller SHRs besteht aus 12 in alpha-helikaler Konformation arrangierter Helices. Hierbei spielen ein Glutaminsäure-Rest der Helix 12 sowie ein Lysin-Rest aus Helix 3 zusammen mit den Helices 3, 4 und 5, welche wiederum eine hydrophobe Tasche bilden, eine besondere Rolle. Sie stellen die ligandenabhängige AF2-Domäne (*activation function 2*) dar. Diese ist wichtig für Protein-Protein-Interaktionen [16, 17]. Kauppi et al. zeigten, dass Helix 12 ebenfalls eine wichtige Rolle im Bezug auf das Verhalten des Rezeptors nach Binden eines Agonisten beziehungsweise Antagonisten einnimmt. Diese scheint dermaßen dynamisch zu sein, dass, sobald ein Antagonist gebunden wird, Helix 12 eine Konformation einnimmt, in der es einem Coaktivator-Peptid nicht mehr möglich ist, mittels seiner LxxLL-Motive an SHRs zu binden [18]. Dadurch kann der Rezeptor nicht mehr in einen aktiven Zustand versetzt werden. Die für alle SHRs ebenfalls hoch konservierte DBD besteht aus zwei alpha-Helices, in denen insgesamt acht Cystein-Reste für die Rekrutierung zweier Zink-Ionen verantwortlich sind und die somit eine Bindung an spezifische DNA-Erkennungsstellen möglich machen [19]. Diese so genannten Zinkfinger motive sind in allen Rezeptoren konserviert und erlauben den Transkriptionsfaktoren an die für den jeweiligen Rezeptor typischen *hormone-response-elements* (HRE) zu binden. Hierbei handelt es sich um zwei sechs-Basenpaar-große, oft palindromische Sequenzen, die durch ein drei-Basenpaar-großes Fragment getrennt sind und für die Bindung des

Rezeptors als Homodimer oder Heterodimer verantwortlich sind [20]. Während die LBD und die DBD innerhalb der jeweiligen Rezeptorfamilie stark konserviert sind, ist die NTD die Domäne, in denen sich alle Rezeptoren deutlich unterscheiden und die somit die Verschiedenheit unter den SHRs definiert. Weiter konnte gezeigt werden, dass NTD ebenfalls wichtig für die Aktivierung beziehungsweise Inhibierung der Expression steroid-regulierter Gene ist. Wird die LBD entfernt, so führt dies zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor. Ein solch aktiver Rezeptor ermöglichte die Identifizierung der ligandenunabhängigen AF1-Domäne in der NTD (*activation function 1*) [21].



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von Steroidhormonrezeptoren.

Endogene Glucocorticosteroide (Cortisol bei Primaten, Corticosteron bei Nagern) sind generell in der Lage, sowohl an den Glucocorticoidrezeptor (GR) als auch an den Mineralcorticoidrezeptor (MR) zu binden, wobei sie eine zehnfach höhere Affinität zum MR als zum GR aufweisen [22]. Weiter postulierten bereits de Kloet et al., dass die Balance zwischen dem Verhältnis von MR und GR für die durch Stress ausgelösten Effekte mitverantwortlich ist [23]. Beide Rezeptoren sind in großer Vielzahl im Hippocampus vertreten und agieren dort als wichtige Regulatoren in Bezug auf Funktion und Struktur dieses Hirnareals. So konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl chronisch hohe Konzentrationen an Glucocorticoiden sowie deren pathologische Abwesenheit morphologische Veränderungen des Hippocampus zur Folge haben [24], und sie damit wichtigen Einfluss auf Lernverhalten und Gedächtnis nehmen [25]. Flood et al. wiesen darüber hinaus nach, dass andere Steroide, wie DHEA (Dehydroepiandrosteron), in der Lage sind, das Gedächtnis von Mäusen dosisabhängig zu verbessern [26]. Weiter wurden Steroide bereits mit neurotrophen Prozessen des Gehirns in Verbindung gebracht. Hierbei zeigten zwei wissenschaftliche Forschungsgruppen unabhängig voneinander, dass Allopregnanolon die Proliferation von Neuronen fördert [27, 28]. Interessant sind in diesem Zusammenhang vor allem die gemeinsamen Beobachtungen, dass besagte Effekte – sowohl die der Gedächtnisverbesserung als auch die der Neurogenese – nicht einer klassischen Dosis-Wirkungs-Beziehung folgen, sondern die Kurven jeweils einen glockenförmigen Verlauf aufweisen. Die Effekte der Steroide sind hierbei meist im nanomolaren Bereich am stärksten und nehmen bei weiterer Erhöhung der Konzentration ab. Man geht davon aus, dass der MR, aufgrund seiner höheren Affinität zu Corticoiden, einen größeren

Einfluss auf den basalen Steroidhaushalt hat, während der GR vor allem in Situationen, in denen erhöhte Corticoid-Konzentrationen vorhanden sind, wichtig ist. So zeichnet sich eine besondere Bedeutung des GRs in Stress-Situationen ab, während der MR vor allem in stressarmen Situationen regulatorische Funktionen ausübt [29].

Solange SHRs keinen ihrer Liganden gebunden haben, liegen diese als Aporezeptoren in einem Komplex mit Hsp90 im Zytosol vor. Nur in dieser Zusammensetzung vermögen sie ihre Liganden zu binden und dadurch resultierende Effekte auszuüben [30]. Um einen Agonisten oder Antagonisten binden zu können und damit in einen (apo)-Hsp90-GR Komplex übergehen zu können, müssen sie zunächst einen Reifungsprozess durchlaufen. Vor allem die Proteine Hsp40, Hsp70, HOP, p23 und nicht zuletzt assoziierte Immunophiline sind in diesem Kontext von zentraler Bedeutung (siehe auch Abbildung 3). Immunophiline binden über ihre TPR-Domänen an Hsp90 und können auf diese Weise in den Komplex integriert werden. Es ist bekannt, dass in diesem Fall Hsp90 als Dimer an den Rezeptor bindet. Obwohl bislang noch keine eindeutige Aussage über die stöchiometrischen Verhältnisse von gebundenen Immunophilinen formuliert werden konnte, geht die am meisten verbreitete Theorie von einer 1:2:1 Verteilung bezogen auf GR:Hsp90:Immunophilin aus [31].

Immunophiline zeichnen sich vor allem durch ihre Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität aus (PPIAse). Hierbei unterscheidet man generell solche, die in der aktiven Tasche die immunsupprimierende Verbindung FK506 binden können (FK506-bindende Proteine – FKBP) und solche, die Cyclosporin A binden (Cyclophiline - Cyps). Im Falle von Steroidhormonrezeptoren kommen als Co-Chaperone vor allem Mitglieder der Immunophilin-Familie infrage (FKBP51, FKBP52 und Cyp-40). Zusätzlich ist jedoch auch ein weiteres Protein, nämlich die Phosphatase PP5 (*protein phosphatase 5*) in der Lage, über seine eigene TPR-Domäne an Hsp90 zu binden und sich somit in den Multimerkomplex zu inkorporieren [32]. Morishima et al. wiesen nach, dass Hsp90 zwingend im Komplex mit dem GR vorliegen muss, damit dieser Steroide binden kann. Wird er von Hsp90 entfernt, schließt sich die hydrophobe Bindungstasche für Liganden und der Rezeptor geht in einen nicht mehr aktivierbaren Zustand über [33, 34].

Zu Beginn der neunziger Jahre konnten Wissenschaftler neben Hsp90 ein weiteres Hitzeschock-Protein aus dem GR-Komplex isolieren, nämlich Hsp70 [35]. Diese Entdeckung führte zu dem Verständnis, dass der GR nach seiner Transkription nicht einfach Hsp90 bindet und somit aktivierbar ist, sondern dass es sich vielmehr um einen Reifungsprozess handelt, an dem mehrere, verschiedene Proteine partizipieren. Dittmar et al. stellten das Assemblierungssystem mit einer minimalen Anzahl an zuvor aufgereinigten Proteinen (Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hop und p23) wieder her und konnten auf diese Weise einen aktiven Rezeptor rekonstituieren [36]. Zudem konnten die Autoren zeigen, dass von den agierenden Chaperonen einzig Hsp70 und Hsp90 essenziell waren, um eine Öffnung der Ligandenbindungsstelle zu ermöglichen [37]. Für Hop und Hsp40 traf dies zwar

nicht zu, jedoch erhöhten beide die Effizienz der Assemblierungsreaktion deutlich. p23 dient vor allem der Stabilisierung des Multimerkomplexes, sobald sich dieser geformt hat [38].

Der komplette Reifungszyklus des GR beginnt zunächst mit dem Binden von Hsp70 in einem ATP-, Kalium- und Hsp40 abhängigen Schritt, sodass ein GR-Hsp70-Komplex gebildet wird. Ein Hsp90-Dimer, welches an HOP (*Hsp-organizing-protein*) gebunden ist, kann nun in diesen Komplex eintreten. Hierfür bindet HOP mit einem seiner zwei TPR-Motive (an dem anderen liegt Hsp90 gebunden vor) an Hsp70. In einem weiteren ATP- und kaliumabhängigen Schritt kann nun ATP an Hsp90 binden und somit eine Konformationsänderung des gesamten Rezeptor-Komplexes auslösen, der letztendlich die Bindungstasche für Steroide öffnet. Außerdem tritt nun p23 ein und stabilisiert das gesamte System. In einem letzten Schritt verlässt HOP den Komplex, gibt die Bindungsstelle an Hsp90 frei und erlaubt es Immunophilinen oder PP5, mit ihren TPR-Domänen an Hsp90 binden zu können und den finalen Rezeptorkomplex somit zu komplettieren. Die zum Schluss in den Komplex eingetretenen TPR-Proteine binden dabei sehr reversibel und können leicht ausgetauscht werden. Da sie SHRs sehr divergent beeinflussen können (je nachdem welches Immunophilin an welchen Rezeptoren gebunden ist), entsteht hierdurch eine sehr große Dynamik bezogen auf das endgültige Verhalten des Rezeptors.

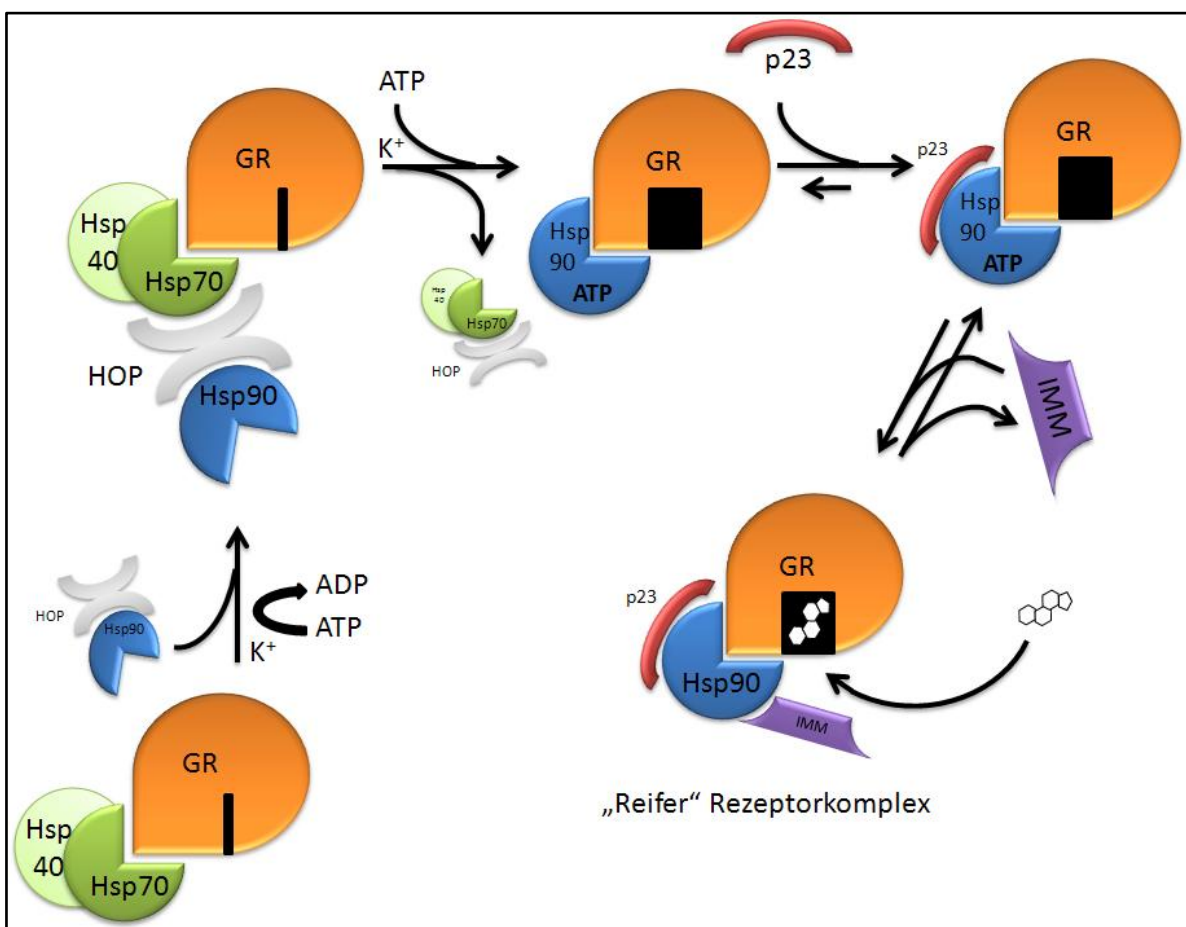


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Assemblierung von Steroidhormonrezeptorkomplexen

Wie in 1.1 bereits beschrieben, leiden depressive Patienten unter zu hohen Cortisol-Spiegeln (Glucocorticoid-Resistenz). Bei ihnen besteht eine Störung der durch zirkulierende Corticoide ausgelösten negativen Rückkopplung, sodass die weitere Sekretion von CRH, ACTH und letztendlich Cortisol nicht herabreguliert wird. Es ist nur konsequent, diese Störung mit einer Fehlfunktion des GRs zu assoziieren. Ein Erklärungsansatz dieser Fehlfunktion sind Mutationen des Rezeptors selbst. Studien an Personen mit verminderter Reaktion im Dexamethason-Stresstest sowie Untersuchungen an Patienten mit bipolaren Störungen ergaben jedoch im Vergleich zu gesunden Probanden keine signifikanten Polymorphismen in beiden Isoformen des GRs [39]. Eine weitere Möglichkeit ist eine verminderte Expression des Rezeptors in wichtigen Hirnarealen, sodass diese keine exakte Antwort auf hohe Cortisol-Spiegel weiterleiten können. Tatsächlich zeigten Webster et al., dass Patienten, die unter Depressionen, Schizophrenie wie auch Bipolaren Störungen litten, in relevanten Hirnarealen wie Cortex und Hippocampus deutlich verminderte Mengen an GR-mRNA aufwiesen [40]. Eine weitere Möglichkeit, das Fehlverhalten zu erklären, sind schließlich Störungen, die durch Co-Regulatoren des GRs ausgelöst werden. In diesem Zusammenhang sind vor allem die Immunophiline FKBP51 und FKBP52 interessant. FKBP51 fungiert hauptsächlich als negativer Modulator auf den GR [41, 42], während FKBP52 die Signaltransduktion dieses Rezeptors positiv moduliert [43]. Binder et al. entdeckten am Max-Planck Institut für Psychiatrie signifikante Polymorphismen im FKBP51 kodierenden Gen (FKBP5 genannt), welche mit einer erhöhten Expression an FKBP51 assoziiert sind und in Verbindung mit variierendem Erfolg von Therapien mit Antidepressiva gebracht werden konnten [44]. Weitere Studien brachten zusätzlich SNPs des FKBP5-Gens (*single-nucleotide polymorphism*) mit bipolaren Störungen und anderen psychischen Krankheiten in Verbindung [45, 46].

1.3 Immunophiline

Die Familie der FKBP's wie auch die der Cyclophiline gehören der Klasse der Immunophilinen an. Namensgebend für beide Gruppen sind ihre klassischen Liganden, nämlich FK506 (FKBP's: FK506-bindende Proteine) und Cyclosporin A (CsA). Immunophilinen zeichnen sich vor allem durch eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität (PPIase Aktivität) aus, wodurch sie in der Lage sind, Peptidbindungen zwischen Prolin und weiteren Aminosäuren zu isomerisieren (cis-trans Isomerisierung; siehe Abbildung 4). Durch die Katalyse dieser Bindung vermögen FKBP's Proteine in ihrer korrekten Faltung zu unterstützen. Die dabei stattfindende cis-trans Konvertierung stellt zumeist den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt von Faltungsreaktionen dar [47] und wird vermutlich u.a. durch Bindung des Substrats in der aktiven Tasche der FKBP's vermutlich unter anderem durch Wasserstoffbrücken stabilisiert [48]. Im Gegensatz zu dem klassischen Verständnis von Chaperonen handelt es sich bei dieser Klasse von Proteinen um richtige Katalysatoren, die den Gleichgewichtszustand der zu katalysierenden Reaktion schneller erreichen, ohne das eigentliche Reaktionsgleichgewicht zu verändern [49]. Bindet ein Ligand (wie beispielsweise FK506 oder CsA) an eines der Immunophilinen, so wird deren katalytische Aktivität meist inhibiert. Weitere wichtige Domänen interagieren mit anderen Proteinen. Auch diese sind durch Einsatz spezifischer Liganden teilweise inhibierbar, was diese Art von Verbindungen äußerst interessant macht. Derzeit sind 17 verschiedene, ihrem Molekulargewicht entsprechend nummerierte FKBP's bekannt, die durch das humane Genom codiert werden und sich neben ihrer PPIase-Aktivität durch unterschiedliche Funktionen auszeichnen. Ein Überblick über diese Proteine sowie deren Aufgaben ist Tabelle 1 zu entnehmen.

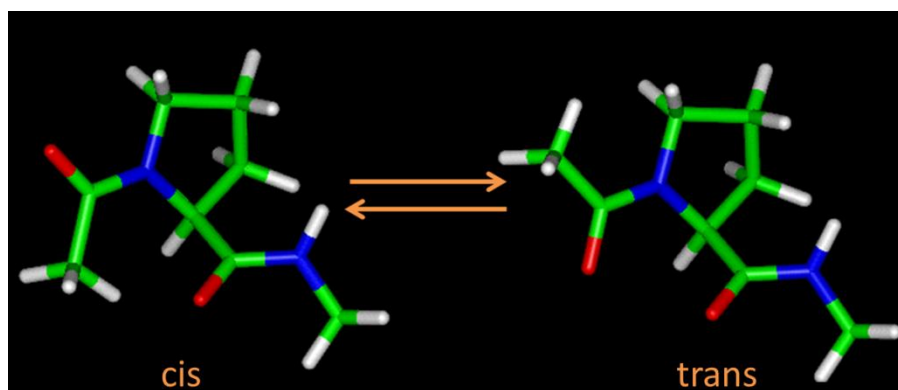


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer cis-trans-Isomerisierung einer Peptidbindung zwischen Prolin und einer weiteren Aminosäure.

FKBP	Bindungspartner	Lokalisation	Funktion
12a, 12.6, 12c [50, 51]	TGFβ-, Ryanoid-, EGFR, Zytosol Inositol-Rezeptoren, FK506- Calcineurin, Rap-mTOR	Zytosol	Zellzyklusregulator, T-Zell- Transkription, T-Zell Signaltransduktion
15p, 22p, 24p, 25p, 63p [50]		ER	Cofaktoren für Proteinfaltung
25n [52]	YY1, HMG-II	Nukleus	Transkription
36 [53]	Clathrin, Hsp72	Nukleus	GA3P-DH-Inhibitor
37, 37i [54, 55]	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptoren	Zytosol	Transkription
38 [56]	FK506, Bcl-Proteine, Hsp90	Zytosol / membran- assoziiert	Karzinogenese
51 [46]	Hsp90, Akt, Rap-mTOR	Zytosol	SHR Modulator
52 [57]	Hsp90, Rap-mTOR	Zytosol	SHR-Modulator
65p [58]	Elastin	ER	Cochaperon
135 [51]	Actin	Zytosol	Transkription, neuronale Wachstumsmodulation

Tabelle 1: Übersicht der im humanen Genom kodierten FKBP

Neben ihren Eigenschaften als Faltungshelfer dienen FKBP als Rezeptoren für FK506 und Rapamycin und vermitteln auf diese Weise deren immunsuppressive beziehungsweise zellregulatorische Effekte. Im Falle des FK506 sind FKBP-FK506-Komplexe in der Lage, an die Phosphatase Calcineurin zu binden und sie zu inhibieren [59]. Durch diese Blockade ist Calcineurin unfähig, den Transkriptionsfaktor NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) zu dephosphorylieren. NF-AT, der ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Expression von IL-2 (Interleukin-2) ist, verbleibt im phosphorylierten Zustand im Zytosol, was letztendlich zu einer reduzierten Expression von IL-2 und einer verminderten Immunantwort führt [60]. Im Gegensatz zu FK506 werden die Effekte von Rapamycin nicht durch eine Calcineurin-Inhibition weitergeleitet, sondern resultieren aus der Blockade der Kinaseaktivität von mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*). Hierdurch werden sowohl die Proteinbiosynthese wie auch das damit einhergehende Zellwachstum inhibiert. März et al. zeigten, dass neben FKBP12 auch Vertreter der größeren Immunophilinen, insbesondere FKBP51 und FKBP52, in der Lage sind, über Rapamycin an mTOR zu binden und dadurch die Phosphorylierung der Substrate S6K (*S6-Kinase*) und 4E-BP1 zu inhibieren [61].

1.4 Neuronale Effekte von FKBP-Liganden

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen immunmodulatorischen Eigenschaften von FKBP-Liganden wurden diese Verbindungen bereits vor etwa zwanzig Jahren mit neuroprotektiven wie auch neurotrophen Eigenschaften in Verbindung gebracht. Bislang lag einer der Erklärungsansätze dieser Funktionen in der Intervention in Calcineurin- oder auch mTOR-abhängigen Signalwegen [62, 63], jedoch schließen derart starke immunmodulatorische Effekte diese Verbindungen gleichzeitig für die Behandlung neurologischer Krankheiten aus.

Die Entdeckung, dass besagte neurotrophe Effekte nicht ausschließlich von den immunmodulatorischen Eigenschaften dieser Liganden-Familie abhängen müssen, inspirierte eine ganze Generation von Medizinalchemikern dazu, neue Moleküle zu synthetisieren, welche Derivate der bekannten Verbindungen FK506 und Rapamycin darstellen ohne dabei eine Modulation des Immunsystems auszulösen. Soche Verbindungen werden allgemein als Neuroimmunophilin-Liganden bezeichnet. Bei ihnen wurde bewusst auf Effektor-Domänen, die für die Interaktionen mit Immunsystem relevanten Proteinen verantwortlich sind, verzichtet. Dieser Umstand versetzt diese Liganden in die Lage, FKBP zu binden, neurotroph zu wirken und gleichzeitig das Immunsystem unangetastet zu lassen. Steiner et al. demonstrierten in diesem Zusammenhang außerdem, dass nicht-immunsuppressive FK506-Analoga den Neuriten-Wuchs in PC12-Zellen verbessern können, während Gold et al. selbiges für humane SH-SY5Y-Zellen aufzeigten [64, 65]. Bemerkenswert sind zusätzlich Daten gleich mehrerer Laboratorien, die besagen, dass diese Moleküle in verschiedensten Tiermodellen Einfluss auf neuropathologische Situationen nehmen, wie beispielsweise Schädel-Hirn-Traumata [66], Parkinson [67], zerebrale Ischämie [68] und diabetische Neuropathie [69].

Strukturell sind Neuroimmunophilin-Liganden entweder Analoga von FK506/Rapamycin, deren Effektor-Domänen derart verändert wurden, dass sie keine Immunreaktion mehr auslösen können, oder kleinere Moleküle, welche die mit FKBP interagierenden Domänen und zusätzlich verschiedene substituierte Reste besitzen. Für einige dieser Verbindungen wurden bereits pharmakokinetische Studien umgesetzt, die belegen, dass FKBP in den verwandten Dosen quantitativ von FK1706 abgesättigt werden können und eine Blockade dieser Proteine über einen längeren Zeitraum hinweg beim Menschen keine Probleme verursacht [70].

Im Zusammenhang des Wirkmechanismus, der neurotrophen Effekten von Neuroimmunophilin-Liganden zugrunde liegen könnte, wurde in der Vergangenheit vor allem das Protein FKBP12 diskutiert. Doch spätestens seit Gold et al. zeigen konnten, dass neurotrophe Effekte auch in primären hippocampalen Neuronen von FKBP12 defizienten Mäusen festzustellen sind, mussten diese Überlegungen aufgegeben werden: FKBP12 kommt als verantwortliches Protein nicht infrage. Stattdessen stellte sich in soeben genannter Arbeit FKBP52 als mögliches Zielprotein heraus.

Zudem wird eine Involvierung von Steroidhormon-Rezeptoren für möglich gehalten, da neurotrophe Effekte von Dexamethason durch den Einsatz von FK506 noch potenziert werden [71]. Die Tatsache allerdings, dass FKBP12 in neurotrophen Prozessen keine Rolle spielt, wurde zusätzlich von Ergebnissen unterstrichen, die belegen, dass Moleküle, die von sich aus nicht an FKBP12 zu binden vermögen, dennoch neurotroph auf SH-SY5Y-Zellen wirken [65].

Subsumiert lässt sich feststellen, dass neurotrophe Effekte von Immunophilin-Liganden–unabhängig von ihrer Möglichkeit der Immunmodulation – zwar bekannt sind, eine genaue Erklärung dieser Wirkmechanismen jedoch noch nicht formuliert werden konnte. Weiter muss als Mangel hervorgehoben werden, dass in diesem Zusammenhang bislang ausschließlich FKBP52 als mögliches Effektorprotein diskutiert wird, sein physiologischer Gegenspieler FKBP51 hingegen nicht.

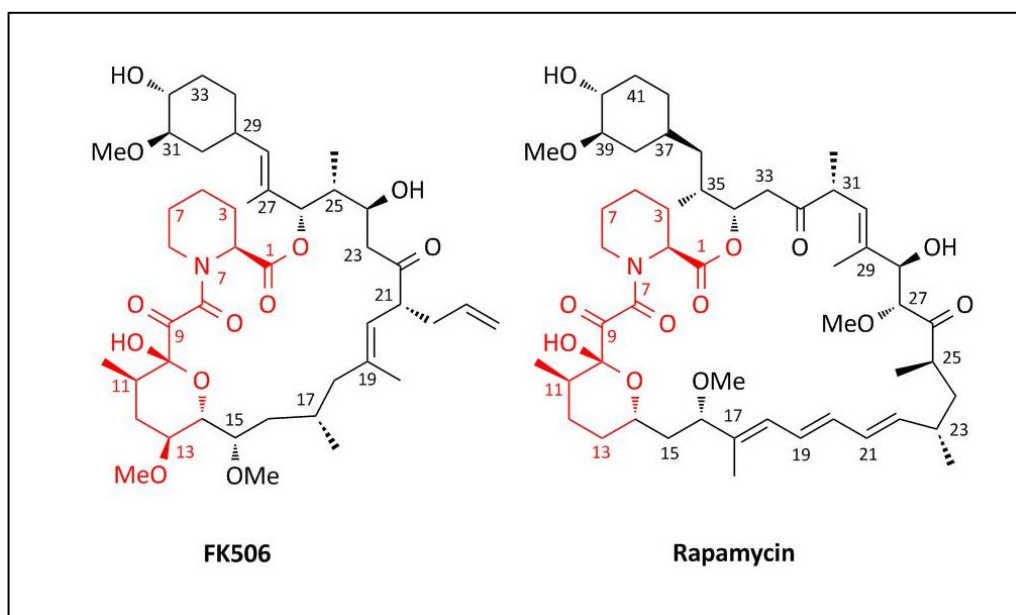


Abbildung 5: Strukturen der Immunophilin-Liganden FK506 und Rapamycin. Die an FKBP bindenden Domänen sind rot gefärbt.

1.5 FKBP51 und FKBP52

Bereits zu Beginn der neunziger Jahre beschrieben erstmals Smith et al. das für die Signaltransduktion von Steroidhormonrezeptoren so relevante FKBP51 (damals p54) [72] als ein an den Progesteronrezeptor assoziiertes Mitglied des Heterokomplexes. Wenige Monate später berichtete Edwin Sanchez von dem ebenfalls in Steroidhormon-Rezeptor-Komplexen vorhandenen Cochaperon FKBP52 (p56) und postulierte wichtige modulatorische Effekte auf SHRs [73]. FKBP51 und FKBP52 besitzen eine 70 prozentige Sequenzähnlichkeit und stimmen darüber hinaus zu 55 Prozent exakt überein. Dies geht mit einer sehr ähnlichen Struktur beider Proteine einher. Sie besitzen eine, dem FKBP12 ähnliche, N-terminale FK1-Domäne mit PPlasen-Aktivität, die gleichzeitig auch als Ligandenbindungsstelle fungiert. Ihr schließt sich mit einem Abstand von neun Aminosäuren eine FK2-Domäne an, die in ihrer Struktur wiederum der FK1-Domäne stark ähnelt, dabei jedoch weder enzymatische Aktivität aufweist noch fähig ist, Liganden zu binden. Am C-terminus befindet sich eine *tetratricopeptid-repeat*-Domäne (TPR-Domäne), die in antiparallelen Helices arrangiert sind. Diese Domäne ermöglicht es FKBP5s, mit dem C-terminalen EEVD-Motiv von Hsp90 zu interagieren und auf diese Art und Weise in SHR-Heterokomplexe rekrutiert zu werden [74-76] (siehe Abbildung 6). In einem Hefemodell konnten Riggs et al. zeigen, dass FKBP52 die Transkriptionsaktivität des GRs signifikant zu erhöhen vermag [43], wobei sowohl PPlase als auch eine intakte TPR-Domäne vorauszusetzen sind [77]. Weiter wurde bereits deutlich, dass FKBP52 durch seine Interaktion mit dem Motorprotein Dynein den retrograden Transport des GRs in den Nukleus positiv beeinflusst [78]. Zusätzlich ist FKBP52 in der Lage, die Transaktivierung von AR [42] und PR [79] zu erhöhen.

Eine wichtige Stellung im Bezug auf den Einfluss von FKBP52 auf die Aktivierung des GRs scheint FKBP51 einzunehmen. So zeigten Riggs et al., dass die Aktivierung der Transkriptionsaktivität des GRs durch FKBP52 durch die Expression von FKBP51 wieder blockiert werden kann. Diese Beobachtung wurde von Davies et al. gestützt, die wiederum bewiesen, dass eine Translokation des GR-Hsp90-FKBP52-Dynein-Komplexes einen vorigen Austausch von FKBP51 gegen FKBP52 voraussetzt [80]. Die antagonistischen Eigenschaften von FKBP51 und FKBP52 in Bezug auf die Modulation von SHRs verdeutlichten Riggs et al. nochmals, indem sie nachwiesen, dass eine Punktmutation in FKBP51 (L119P) und in FKBP52 (P119L) dazu führte, dass sich die besagten Effekte größtenteils umkehrten [81]. Zudem zeigten sie, dass für eine erfolgreiche Modulation der SHRs die FK1-Domäne zwar vorhanden sein muss, eine Notwendigkeit für die PPlase-Aktivität jedoch nicht besteht. Weitere Hinweise auf wichtige Funktionen von FKBP52 als Stressprotein lassen sich aus der Tatsache schließen, dass FKBP52 im Gegensatz zu FKBP51 sowohl durch Hitze und Chemikalien als auch durch zellulären Stress induziert wird [73].

Die von FKBP51 am besten charakterisierten Effekte sind solche, die Steroidhormonrezeptoren involvieren. Neben den bereits beschriebenen inhibitorischen Effekten auf den GR im Menschen zeigten Denny et al., dass Affenspezies der Neuen Welt – verglichen mit dem humanen FKBP51 – noch deutlich potenter in der Lage sind, den GR zu inhibieren [82]. Dies und die Tatsache, dass FKBP51-Plasma-Spiegel in besagten Affen signifikant höher sind als im Menschen, tragen vermutlich zur so genannten Glucocorticoid-Resistenz im Totenkopffäffchen bei [83]. Hierunter versteht man die Tatsache, dass deutlich höhere Cortisol-Spiegel von Nöten sind, um eine vergleichbare durch den GR induzierte Genexpression zu detektieren.

Wie schon in 1.1 beschrieben, nehmen sekretierte Corticosteroide wichtigen Einfluss auf die negative Regulation der HPA-Achse. Interessant hierbei ist die Tatsache, dass FKBP51 unter anderem durch Corticosteroide stark induziert wird [84]. Dadurch ergibt sich eine sehr interessante negative Rückkopplung auf den GR, da das unter Kontrolle von GREs stehende FKBP51 die Transkriptionsaktivität des GRs direkt inhibieren und somit das Signal durch den Rezeptor terminieren kann. Auf gleiche Weise scheint FKBP51 wichtigen Einfluss auf andere Steroidhormonrezeptoren zu nehmen, und zwar insofern, dass nicht nur die Aktivität des GRs, sondern auch die des Progesteron- und Androgenrezeptors durch FKBP51 beeinflusst wird [85]. Hierdurch ergeben sich zusätzlich interessant Rückkopplungs-Möglichkeiten zwischen den unterschiedlichen Rezeptor-Signalwegen. Ni et al. stellten fest, dass FKBP51 in androgen-unabhängigen Prostatakrebsformen hochreguliert ist und AR-Signale aktiviert, wodurch es beschleunigenden Einfluss auf das Wachstum von Tumoren hat [86]. Weiter zeigten Jinwal et al., dass FKBP51 den Abbau von Tau-Proteinen blockiert und dessen Phosphorylierungsstatus verändert. Beide Mechanismen führen zu Tauopathien, wobei Alzheimer die wohl bekannteste Erkrankung dieser Gruppe ist [87].

Ergebnisse von Soontornniyomkij et al. deuten zusätzlich eine Verbindung zwischen veränderten FKBP51-Spiegeln im Alter und daraus resultierenden Gedächtnisbeeinträchtigungen in Wildtyp-Mäusen an [88]. Im Gegensatz zu FKBP52-*knockout*-Mäusen zeigen FKBP51-k.o.-Mäuse unter basalen Bedingungen keine prägnanten Phänotypen. Männliche Mäuse, in denen FKBP52 erfolgreich ausgeschaltet wurde, weisen deutliche Unterentwicklungen ihrer Reproduktionsorgane auf (unterentwickelte Penisse, verkleinerte Prostata, verringerte Spermiumbeweglichkeit und Hypospadie). Weibchen zeigen rein optisch keine deutlich erkennbaren Veränderungen, sie sind jedoch unfruchtbar [42]. FKBP51-k.o.-Tiere weisen dagegen normal entwickelte Geschlechtsorgane auf und sind fruchtbar. Touma et al. zeigten allerdings, dass sich bezogen auf Stress das Verhalten deutlich ändert. Der Verlust von FKBP51 führte zu einer Verbesserung der aktiven Stressbewältigung und einer Erniedrigung der HPA-Achsen-Reaktivität auf der Grundlage von Stresseinwirkung [89]. Diese Ergebnisse wurden durch Hartmann et al. bestätigt, die zeigen konnten, dass 51-k.o.-Mäuse in

einem Modell des chronischen Sozialstress (*social defeat stress*) weniger auf neue akute Stressoren reagierten und sich zusätzlich von dem bereits Erlebten besser erholen konnten [90]. All diese von FKBP51 verursachten Effekte verdeutlichen dessen Brisanz in pathologischen Veränderungen des Organismus und verstärken die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses der Biologie dieses Immunophilins.

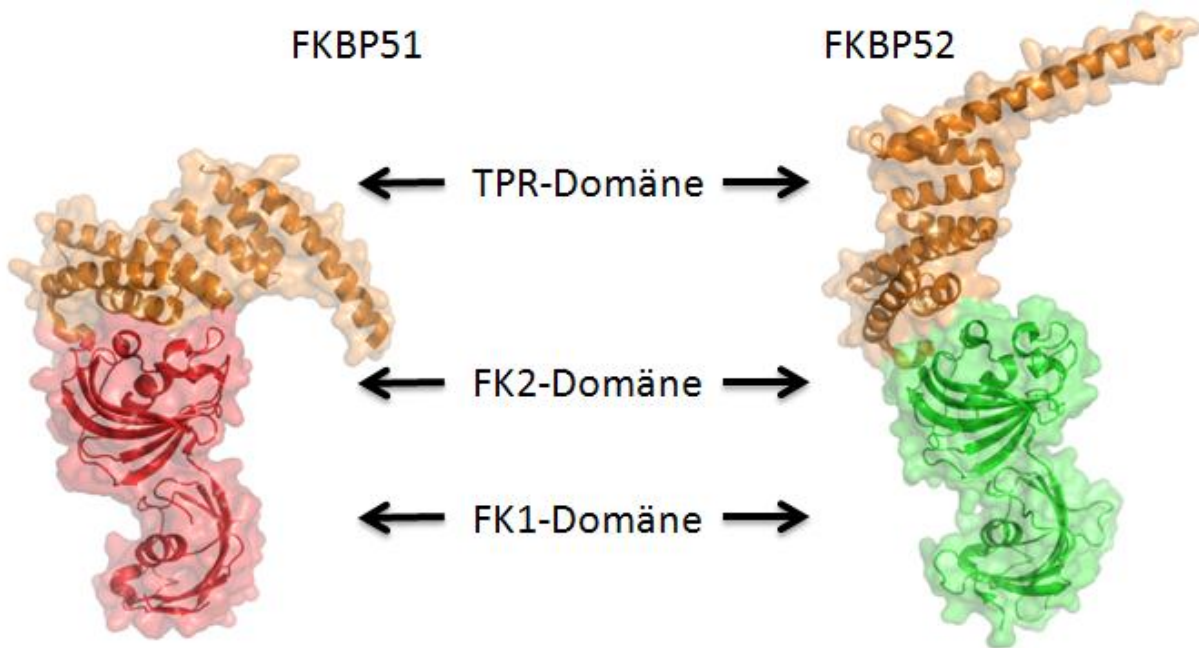


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur von FKBP51 und FKBP52 [91]

1.6 Neurogenese, Synaptogenese und der Effekt von Antidepressiva

Die genauen Ursachen für die Entwicklung von psychischen Störungen, wie Depressionen, Angststörungen oder auch Schizophrenie, sind noch nicht hinreichend geklärt. Als eines der meist akzeptierten Modelle über die Entwicklung einer Depression gilt das Diathese-Stress-Modell [92]. Hierbei wird davon ausgegangen, dass eine Kombination aus biologischen Faktoren, wie Erbanlagen und epigenetische Faktoren, und die dadurch angeregte ontogenetische Entwicklung sowie stark prägende Erlebnisse, wie zum Beispiel Angst oder Stresserlebnisse, einen Einfluss auf die Entstehung einer Depression nehmen. Im Falle genetischer Faktoren könnte es sich beispielsweise um Polymorphismen handeln, die Neurotransmission, HPA-Achse oder Neuroplastizität beeinflussen. Um eine effektive Behandlung einer solchen Krankheit gewährleisten zu können, gilt es in erster Linie, die neurobiologischen Vorgänge besser verstehen zu lernen. Eines der wichtigsten Hirnareale im Bezug auf kognitive Funktionen und Stimmung ist der Hippocampus [93]. Verschiedene Studien stellten bereits Assoziationen zwischen psychischen Störungen wie Depressionen oder auch Schizophrenie und einer Verringerung des hippocampalen Volumens her [94, 95]. Weiter konnte bereits festgestellt werden, dass eine Besserung der Symptome mit einer anschließenden Vergrößerung des Bereichs einhergeht. Auch konnte die adulte Neurogenese bereits im Menschen nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um Prozesse, die nicht ubiquitär auftreten, sondern ausschließlich in zwei bestimmten Bereichen des adulten Gehirns, der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels und der subgranularen Zone des Gyrus dentatus im Hippocampus [96]. Nachweislich entstehen in adulten Säugetieren neuronale Vorläuferzellen, die sowohl in Neurone, Astrozyten wie auch Oligodendrozyten differenzieren können [97]. Erste präklinische sowie klinische Ergebnisse fielen derart vielversprechend aus, dass die hippocampale Neurogenese bereits als Wirkstoffziel zur Behandlung von Depressionen diskutiert wurde [98, 99]. Weitere Hinweise auf einen solchen Mechanismus liefern Studien, die zeigen, dass ein gesunder Lebensstil und körperliche Ertüchtigung (beides Faktoren, die der Entstehung einer Depression nachweislich vorbeugen können) die hippocamale Neurogenese begünstigen, während Alterung und Stress mit einer Verminderung der Neurogenese und der Entwicklung von Gedächtnisstörungen, Angst und Depressionen einhergehen [100-102].

Zur Behandlung von Depressionen stehen derzeit verschiedene verwandte Wirkstoffklassen zur Verfügung. Die am weitesten verbreiteten Medikamente sind SSRIs (*selective serotonin reuptake inhibitors*), NRIs (*norepinephrine reuptake inhibitors*), TCAs (*tricyclic antidepressants*) und MAOIs (*monoamine oxidase inhibitors*). Neben diesen medikamentösen Behandlungsformen existieren

außerdem alternative Behandlungsmöglichkeiten wie DBS (*deep brain stimulation*) oder TMS (*transcranial magnetic stimulation*). Die erste Generation der Antidepressiva, die Monoaminoxidase-Inhibitoren, wurde zufällig entdeckt. Nachdem die pharmakologische Wirkung dieser Stoffgruppe entschlüsselt werden konnte – nämlich der Eingriff in den Monoamin-Haushalt– nahm man an, dass ein gestörter Neurotransmitter-Spiegel die Ursache für die Entwicklung von Depressionen sei. Weiter ging man davon aus, dass Substanzen, die die Verfügbarkeit dieser Transmitter im synaptischen Spalt erhöhen, zu einer Besserung der Symptomatiken führen [103]. Korrekt in diesem Zusammenhang ist, dass alle Antidepressiva die Neurotransmission durch eine Erhöhung der Transmitterzahl verbessern. Die Wirkmechanismen, die einer solchen Änderung zu Grunde liegen, sind jedoch different. So inhibieren etwa SSRIs die Entfernung von Serotonin aus dem synaptischen Spalt, während MAOIs den enzymatischen Abbau von Monoaminen verhindern. Letztendlich kommt es jedoch in allen Fällen zu einer Akkumulation der Botenstoffe.

Ein fundamentales Problem der Monoamin-Hypothese liegt in der zeitlich verzögerten Wirkung aller Antidepressiva. So sind diese in der Lage, bereits nach einigen Stunden ihre primäre biochemische Wirkung voll zu entfalten, während eine Besserung der pathologischen Situation eines Patienten meist erst nach Wochen einsetzt. Eine Erklärung für solch eine Wirkung ist eine stufenweise Desensibilisierung von Monoaminrezeptoren. Dagegen stehen jedoch Studien, die belegen, dass eine Verknappung des Serotonin-Vorläufers Tryptophan oder auch die Blockade der Tyrosinhydroxylase –die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese der Katecholamine darstellt – keine depressiven Symptomatiken in gesunden Patienten auslösen [104]. Behandelte Patienten hingegen neigen deutlich zu Rückfällen in eine Depression [105]. Diese Tatsache und darüber hinaus der Umstand, dass etwa ein Drittel aller Patienten überhaupt nicht auf die Behandlung mit antidepressiven Wirkstoffen reagiert, legt die Vermutung nahe, dass die durch Antidepressiva modifizierte Neurotransmission nicht die finale Erklärung für den therapeutischen Mechanismus sein kann [106]. So zeigten zuletzt Boldrini et al., dass sowohl SSRIs als auch TCAs die Neurogenese im Hippocampus zu erhöhen vermögen [107].

Neben der Neurogenese werden im Kontext von Depressionen und deren Behandlung ebenfalls Effekte diskutiert, die für die Neubildung, Erhaltung oder Modulation von Synapsen verantwortlich sind. Diese Prozesse werden allgemein unter dem Begriff „Synaptogenese“ geführt [106]. Hierunter versteht man sämtliche Prozesse, beginnend bei der Synthese neuer Rezeptoren und synapsen-strukturrelevanter Proteine bis hin zur Modulation und Reorganisation vorhandener Synapsen, was letztlich eine Änderung in der Kommunikation im neuronalen Netzwerk bewirkt. Ob und inwieweit die konkurrierenden Prozesse Synaptogenese und Synapseneleminierung im Bezug auf neuronale Plastizität und die Anpassung auf äußere Stressoren eine zentrale Rolle einnehmen, ist noch nicht hinreichend geklärt. So findet Synaptogenese vor allem im Pränatal- und Säuglingsalter

statt und wird später durch eine vermehrte Eliminierung der Synapsen abgelöst [108]. Diese größtenteils zeitlich voneinander entkoppelten Prozesse dienen insoweit hauptsächlich der Stabilisierung des neuronalen Netzwerks, dass sehr früh viele Synapsen gebildet und diese im Nachhinein sukzessive „aussortiert“ werden. Im adulten Gehirn ist die Synaptogenese stark limitiert und Synapsen bleiben meist über Monate und Jahre erhalten [109].

Neben der Synaptogenese und der Eliminierung von Synapsen spielen auch modulatorische Prozesse, die auf dendritische Dornfortsätze (*spines*) abzielen, eine wichtige Rolle im Gesamtkontext der synaptischen Plastizität (*spinogenesis* und *spine elimination*) [110]. Erste Hinweise, dass strukturelle synaptische Änderungen einen Einfluss auf die Entwicklung und Progression von Depressionen nehmen könnten, ergab die Beobachtung, dass Mäuse, die sowohl chronischem als auch unvorhersehbarem Stress ausgesetzt waren, Reduktionen des postsynaptischen Proteins PSD-95 aufwiesen. Weitere Studien zeigten, dass es ebenfalls zu Reduktionen von Synaptophysin, GluR1 und Synapsin I kommt [111]. Die Änderungen traten dabei vor allem im präfrontalen Kortex, aber auch im Hippocampus auf. Ähnlichkeiten in der geänderten Expression von synaptischen Proteinen konnten auch postmortem in depressiven Patienten festgestellt werden [112, 113]. So zeigten unter anderem Duric et al. signifikante Dysregulationen von Genen im Hippocampus depressiver Patienten, die relevant für die Aufrechterhaltung und Regulation der Synapsenstruktur und deren Funktion sind [114]. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass es in Ratten, die mit therapeutisch wirksamen Dosen von Antidepressiva, wie Fluoxetin und Imipramin, behandelt wurden und in denen gleichzeitig durch die Gabe von Methylazoxymethanol die Neurogenese blockiert wurde, neben einer Verbesserung der Depressions-Verhaltensmarker zu einer erhöhten Synaptogenese wie auch einer verstärkten Umgestaltung des dendritischen Netzwerkes kommt. Dies zeigt, dass nicht nur die Neusynthese von Neuronen, sondern auch die Erhaltung und Umgestaltung bereits vorhandener neuronaler Strukturen funktionell äußerst wichtig ist [115]. Betrachtet man diese Erkenntnisse, so erscheint eine Korrelation der Reduktion des hippocampalen Volumens, ausgelöst durch Depressionen, und des mit einer erfolgreichen Therapie einhergehenden Wiederanstiegs durch die Modulation von Synaptogenese und nicht zuletzt des Anstiegs der adulten Neurogenese im Hippocampus äußerst naheliegend.

1.7 Der Effekt von Steroiden auf neuronale Prozesse

Neben den bereits beschriebenen hormonellen Effekten der vom Körper sekretierten Steroide haben diese weitere physiologisch äußerst relevante Einflüsse sowohl in der Peripherie als auch im zentralen Nervensystem. Hierbei spielen vor allem zwei Klassen von Steroiden eine besondere Rolle: Neurosteroiden und Glucocorticoide. Unter Neurosteroiden versteht man Steroide, die von Neuronen des zentralen Nervensystems synthetisiert werden. Zu den Wichtigsten zählen DHEA (Dehydroepiandrosteron), Pregnenolon, Progesteron, Deoxycorticosteron und Allopregnanolon [116]. Es konnte bereits ausgiebig belegt werden, dass besagte Neurosteroiden regulatorisch in neuronale Prozesse, etwa den Neuriten-Wachstum, die Myelinierung und neuronale Zellprotektion sowie die Neurogenese eingreifen können. So zeigten Compagnone et al., dass DHEA in der Lage ist, die Absolut-Längen von Tau-1-haltigen Axonen in primären embryonalen Mäuseuronen zu erhöhen [117]. Dagegen scheint DHEA selbst keine Effekte auf Dendriten auszuüben. Die sulfatierte Version des Steroids jedoch (DHEAS) führt zu verlängerten Neuriten, welche verstärkt den dendritischen Marker MAP-2 exprimieren. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass DHEA die Synapsendichte in der CA1-Region des Hippocampus zu erhöhen vermag und somit ebenfalls die Synaptogenese beeinflusst [118]. Progesteron wurde bislang vor allem in Verbindung mit wichtigen Reparaturmechanismen von Myelinwänden beschrieben [119]. In diesem Zusammenhang wirkt es jedoch auch auf die Induktion und Proliferierung von myelinisierenden Oligodendrozyten [120]. Zudem nimmt Progesteron eine entscheidende Stellung in der Expression des für die Entwicklung und Modulation von Neuronen sehr wichtigen Neurotrophins BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) ein. So zeigten Gonzalez Deniselle et al., dass Progesteron die mRNA-Expression von BDNF in Neuronen erhöhen und dadurch neuroprotektiv auf das zentrale Nervensystem (ZNS) wirken kann [121]. Ein weiterer wichtiger Effekt von Neurosteroiden im Bezug auf Protektion und Erhaltung neuronaler Plastizität sind neben ihrem Einfluss auf Neuritenwachstum, Myelinisierung und BDNF-Expression ihre antiapoptotischen Effekte: Die wichtigsten Neurosteroiden (DHEA, DHEAS, Allopregnanolon und Progesteron) sind in antiapoptotische Schutzvorgänge des ZNS involviert [122]. Neben all diesen neuroprotektiven Mechanismen ist DHEA überdies in Zusammenhang mit der Neurogenese beschrieben worden. Karishma et al. zeigten, dass DHEA die Anzahl neu gebildeter Neuronen im Gyrus dentatus des Hippocampus erhöht und darüber hinaus die von Corticosteron ausgelöste suppressive Wirkung auf besagte Neuronen blockiert [123].

Die in der Peripherie synthetisierten Glucocorticoide nehmen die zweite bedeutende Stellung in der neuronalen Zellhomöostase ein. Nachweislich hohe Glucocorticoid-Spiegel (GC) im Körper üben negativen Einfluss auf die strukturelle wie auch funktionelle Plastizität limbischer Hirnareale wie den Hippocampus aus [124]. Des Weiteren wurden die Steroidhormone in Zusammenhang mit

neuronalen Zelltod [125] und verminderter Neurogenese gebracht [126]. So können hohe GC-Plasmaspiegel durch eine Verringerung des Soma-Anteils, nuklearer Pyknose und dendritischer Atrophien von CA3-pyramidalen Neuronen sowie eine negative regulierte Neurogenese im Hippocampus insgesamt zu einem Volumenverlust des Hirnareals führen [127, 128]. Während viele Studien bereits die Effekte von GCs im Gehirn ausgiebig beleuchtet haben, können bislang keine wissenschaftlich soliden Aussagen über den molekularen Wirkmechanismus getroffen werden. Einer der bislang diskutierten und möglicherweise vielversprechendsten Wirkmechanismen der GCs sind Neurotrophin-involvierende Prozesse. Neurotrophine sind Schlüsselregulatoren neuronaler Plastizität. Zu den wichtigsten dieser Signalstoffe gehört BDNF, das nachweislich starken Einfluss auf die Synaptogenese und *Spine*-Modulierung sowie auf die neuronale Protektion und Neurogenese ausübt [129]. Den Hauptteil seiner Wirkung entfaltet BDNF hierbei durch die Rezeptortyrosinkinase TrkB (*tropomyosin-related kinase B*). Eingegangene Signale werden daraufhin über Ras-Raf-MEK [MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)/ERK (*extracellular signal regulated kinase*)], PI3K-Akt (*phosphatidylinositol-3-kinase-murine thymoma viral oncogene homolog*) oder PLC- γ -Signale (*phospholipase C- γ*) integriert und weitergeleitet [130, 131]. BDNF wird im Hippocampus stark exprimiert und nimmt eine zentrale Stellung in der Bildung von Synapsen wie auch in der Verstärkung der Anzahl und Dichte selbiger ein [132]. Weitere auf die Plastizität bezogene wichtige Eigenschaften von BDNF sind die Verstärkung der Freisetzung von Neurotransmittern, postsynaptischen glutamatergen Signalströmen und hippocampaler Neurogenese sowie die Protektion und Reifung von Neuronen [133]. Sehr interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der Nestler-Gruppe, die belegen, dass chronischer Stress zu einer verminderten Expression von BDNF führt [134]. Zhang et al. zeigten zudem, dass eine anschließende chronische Behandlung mit Antidepressiva zu einer Erhöhung des BDNF-Spiegels führt [135]. Außerdem konnte wiederholt festgestellt werden, dass Corticosteron äußerst potent in der Lage ist, BDNF-mRNA-Spiegel sowohl kortikal wie auch hippocampal herabzuregulieren [136, 137]. Hierbei nehmen GCs nicht nur elementaren Einfluss auf die Expression und Stabilität der BDNF-mRNA, sondern auch auf die Modulation der BDNF-Synthese sowie deren Sekretion und weitere Prozessierung. So können laut Shah et al. GCs beispielsweise inhibitorisch auf die Translation von BDNF einwirken [138] und deren Exozytose durch Regulation von Annexin A1 potent blockieren [139, 140]. In Studien, die sich näher mit den molekularen Mechanismen der GCs in Bezug auf deren eigentliche Rezeptoren beschäftigten, stellte man fest, dass Aldosteron (ein potenter Ligand für den Mineralcorticoid-Rezeptor – MR) zu einer Erhöhung der BDNF-mRNA in primären kortikalen Neuronen von Ratten führt, während Dexamethason (Ligand des Glucocorticoid-Rezeptor – GR) selbige herabreguliert [141]. Eine endgültige Klärung dieses Mechanismus konnte bislang jedoch nicht vollzogen werden, da keine deutlichen Ergebnisse unter Einsatz von selektiven Antagonisten erzielt wurden und die Problematik, dass Liganden dieser beiden

Rezeptoren in den von den Autoren verwendeten Konzentrationen nicht exklusiv an einen der beiden Rezeptoren binden, sondern diese in gleicherweise okkupieren, bis dato nicht weiter diskutiert wurde. Evident wurde letztgenannte Problematik anhand GR-überexprimierender Mäuse, deren BDNF-Expression sowohl im Hippocampus [142] als auch in der Amygdala [143] hochreguliert ist. Sichergestellt in diesem Zusammenhang ist jedoch die Aussage, dass zirkulierende GCs einen modulativen Effekt auf die Expression sowie die Sekretion und nicht zuletzt die Signalweiterleitung von BDNF haben und somit zentral auf die strukturelle sowie zelluläre Plastizität des Gehirns einwirken und dessen Funktion dadurch nachhaltig beeinflussen können.

1.8 Neuroblastoma Zelllinien

Um neuronale Prozesse in *in-vitro*-Modellen näher untersuchen zu können, eignen sich primäre Zellkulturen, bestehend aus Neuronen, besonders gut. Dennoch sei an dieser Stelle erwähnt, dass diese auch einige nicht zu vernachlässigende Nachteile bezüglich ihrer meist sehr starken Heterogenität, Unfähigkeit zur Zellteilung und diffizilen Handhabung aufweisen. So ist es zum Beispiel nicht möglich, Neuronen über einen längeren Zeitraum in Kultur zu halten. Weiter besteht bei primären Zellkulturen stets die Gefahr von Kontaminationen aus nicht neuronalen Komponenten und somit der Kultivierung und Analysierung fremder Zellen. Eine Alternative für Neuronen stellen daher Zellen dar, die aus Neuroblastomen (NB) gewonnen wurden. Dabei handelt es sich um Tumorzellen der Neurralleiste, die fähig sind, *in-vitro* zu proliferieren und durch einen Auslöser zu Zellen mit partiell neuronalen Eigenschaften zu differenzieren [144]. Die am weitesten verbreiteten NB-Zelllinien sind die aus Ratten gewonnen PC-12, humane SH-SY5Y sowie murine Neuro-2a (N2a) [145, 146]. Die Fähigkeit nicht nur proliferieren sondern auch durch einen Stimulus „auf Kommando“ differenzieren zu können, machen diese Zellen zu einem außerordentlich nützlichen Werkzeug, um neuronale Prozesse im Rahmen von Zellkulturen zu studieren. Nicht zuletzt können auf diese Art und Weise pädiatrische Neuroblastome, Neurotoxizität, virologische Studien und nicht zuletzt molekulare zelluläre Aspekte neuronaler Differenzierung untersucht werden [147].

Um eine ungefähre Aussage über die Neurotoxizität neuer potenzieller Wirkstoffe treffen zu können, müssen diese zunächst auf ihre Verträglichkeit im ZNS getestet werden. Über Jahrzehnte wurden hierfür Tierversuche unternommen, welche nicht nur kostspielig, sondern auch aus ethischen Gründen in einer modernen Gesellschaft, die sich nicht nur über ihr eigenes Wohl, sondern auch das der Tiere definiert, soweit wie irgend möglich vermieden werden sollten. Hierfür stellen *in-vitro*-Zellkulturen eine sehr gute Alternative dar [148]. Primäre Zellen weisen allerdings – wie bereits erwähnt – den Nachteil auf, dass sie zum einen nicht immer homogen sind und zum anderen stets aus tierischen Quellen neugewonnen werden müssen. Daher werden humane wie auch murine Zelllinien mittlerweile sehr erfolgreich zum Testen von Viren und medizinischen Wirkstoffen eingesetzt [149]. Weitere wichtige Einsätze von NB-Zelllinien finden sich in der Entwicklung und Überprüfung von Insektiziden. Hierbei handelt es sich meist um Phosphorsäureester und Carbamate, die sehr potent in der Lage sind, die für die Eliminierung des Neurotransmitters Acetylcholin verantwortliche Acetylcholinesterase zu blockieren. NB-Zellen exprimieren ebenfalls die für die Neurotransmission relevanten Esterasen, sodass sie sich sehr gut als Testobjekte eignen [150]. Andere Anwendungen finden NB-Zellen in modernen Anti-Malaria- und Krebsmedikamenten, bei der Beurteilung von Impfstoffen und der Untersuchung verschiedenster Virus-Wirt-Interaktionen. So konnten bereits

pathologische Eigenschaften von Viren auf das ZNS (*in-vivo*) in diesen *in-vitro*-Modellen reproduziert und analysiert werden [151, 152].

Zusätzliche wichtige Untersuchungsmöglichkeiten von NB-Zelllinien stellen die Prozesse neuronaler Differenzierung dar. Besagte Zelltypen sind bereits ergiebig untersucht und beschrieben worden und eignen sich durch die Möglichkeit, den Zeitpunkt der Differenzierung genauestens kontrollieren zu können, äußerst gut, um vor allem frühe Entwicklungsstadien von Neuronen zu untersuchen [153]. Dabei werden vor allem elementare molekulare Vorgänge beleuchtet, die für die Entwicklung bestimmter Phänotypen relevant sind. Von Interesse sind in diesem Zusammenhang vor allem solche Prozesse, die neuronale Entwicklung, synaptische Plastizität sowie Reifeprozesse von Vorläuferstadien in das endgültige Neuron involvieren. Um eine Differenzierung dieser Zellen auszulösen, gibt es unterschiedliche oft Zelltyp-abhängige Behandlungsmöglichkeiten. Unterschieden werden vor allem zwei große Klassen: solche, die eine Differenzierung durch die Blockade des Zellzyklus auslösen, und solche, die keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen nehmen. So können zum Beispiel Retinol und NGF (*nerve growth factor*) eine Differenzierung auslösen ohne proliferierende Zellen zu arrestieren, während etwa der Entzug von Serum eine Differenzierung mit einhergehendem Stillstand des Zellzyklus auslöst. *In-vitro* können solche Differenzierungsprozesse entweder visuell durch Veränderungen der Morphologie ausgemacht oder durch die Charakterisierung funktioneller Marker wie tau, MAP-2 (*microtubule-associated protein2*) oder Synaptophysin (p38) bestimmt werden. Subsumiert lässt sich festhalten, dass durch den Einsatz von NB-Zelllinien wie SH-SY5Y und Neuro-2a molekulare Mechanismen der Mitose und Differenzierung, aber auch Apoptose von Neuronen qualitativ hochwertig, aber auch simpel und nachhaltig untersucht werden können. Dies macht diese Art von Zellen zu einem sehr wertvollen Werkzeug, um neuronale Prozesse besser beleuchten und verstehen zu können.

1.9 Ziel der Arbeit

Für FKBP-Liganden konnten bereits in der Vergangenheit neurotrophe Eigenschaften nachgewiesen werden. Allerdings wurden die relevanten Zielproteine dieser Verbindungen bislang nie geklärt. Spätestens seit zusätzlich Steroide mit verwandten neurologischen Prozessen in Verbindung gebracht werden konnten, ist es dringend an der Zeit, die molekulare Ursache solcher Effekte auf neuronale Zellen mechanistisch zu untersuchen.

Die Tatsache, dass sowohl Immunophilin-Liganden als auch Steroide sehr untypische, glockenförmige Dosis-Wirkungs-Verhalten in Bezug auf neuronale Entwicklungsprozesse aufweisen und moderne Antidepressiva gleichermaßen mit der Zelldifferenzierung wie auch der Regulation der Steroidhormon-Rezeptoren-Aktivität assoziiert wurden, veranlasst uns festzustellen, ob und inwieweit all diese Systeme miteinander in Verbindung stehen.

Hierfür sollten Effekte selektiver Agonisten wie auch Antagonisten von Steroidhormonrezeptoren untersucht und deren Relevanz in neuritogenen Prozessen abgeschätzt werden. Weiter wurde durch Verwendung unterschiedlicher Isoformen und Mutanten von FKBP, aber auch durch Verwendung von selektiven Inhibitoren dieser Proteine die biochemischen Wirkmechanismen von FKBP51 und FKBP52 auf neuronale Zellsysteme molekularbiologisch untersucht. Zudem sollte geklärt werden, ob die von FKBP ausgelösten Effekte in Zusammenhang mit den regulativen Differenzierungsmechanismen von Steroiden stehen oder diese sogar kontrollieren. Überdies wurde die vorliegende Arbeit von der Frage geleitet, ob und inwieweit FKBP51 ein wichtiger Regulator neuronaler Differenzierung ist und ob eine pharmakologische Inhibition dieses Proteins gegebenenfalls erstrebenswert für die Besserung psychischer Krankheiten sein könnte.

Nicht zuletzt sollte diese Arbeit einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Biologie und Pharmakologie von FKBP51 in neuronalen Zellen leisten und damit maßgeblich zur Entwicklung neuer Antidepressiva, Therapien und schlussendlich zur Heilung von Depressionen beitragen.

2 Material

2.1 Chemikalien

[1,2,4,6,7- ³ H(N)]-Dexamethason	Perkin Elmer (Waltham/USA)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1)	Serva (Heidelberg)
Adenosin 5'-Triphosphat	Roth (Karlsruhe/D)
Agarose	Biozym (Oldendorf/D)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe/D)
Aktivkohle	Roth (Karlsruhe/D)
Aldosteron	Molekula (München/D)
Ammoniumperoxodisulfat	Roth (Karlsruhe/D)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe/D)
Anionenaustauscher AG1-X8 Resin	Bio-Rad (München/D)
Antascomicin B	Stephen Ley (Cambridge/UK) [154]
Anti-FLAG M2 Magnetic beads	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Anti-FLAG M2 affinity resin	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Bradford Lösung	Bio-Rad (München/D)
Borsäure	Calbiochem (San Diego/USA)
Brilliant Blue R250	Roth (Karlsruhe/D)
Bovine Serum Albumine (BSA)	Roth (Karlsruhe/D)
Bromophenol Blau	Merck (Darmstadt/D)
CK97 (Substanz 1d [155])	AG Hausch (MPI für Psychiatrie /D)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe/D)
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Chemiluminescent HRP Substrate (ECL)	Merck-Millipore (Billerica/USA)
CORT108297	AG Almeida (MPI für Psychiatrie/D)/ Corcept Therapeutics (Menlo Park/USA)
D-AP5	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz/USA)
D(-)-2-Amino-5-phosphonovaleric acid (D-AP5)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz/USA)
Desoxynucleotid Mix	NEB (Frankfurt am Main/D)

2. Material

Dextran T70	Roth (Karlsruhe/D/D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe/D)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Gibco (Carlsbad/USA)
1,4-Dithiotreitol	Roth (Karlsruhe/D)
Dihydrotestosteron (DHT)	Sigma-Aldrich (St.Louis/USA)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe/D)
EDTA (Titriplex III)	Merck (Darmstadt/D)
Ethidiumbromide	Roth (Karlsruhe/D)
EZview Red Anti-HA Affinity Gel	Sigma-Aldrich (St.Louis/USA)
FK1706	Astellas Pharma Inc. (Tokyo/Japan)
FK506 (Tacrolimus)	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
FLAG peptide	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
GC-buffer	NEB (Frankfurt am Main/D)
Geldanamycin	Roth (Karlsruhe/D/D)
GlutaMAX	Gibco (Carlsbad/USA)
Glycine	Roth (Karlsruhe/D)
Glycerol (86-88% (v/v))	Roth (Karlsruhe/D)
HA Peptid	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco (Carlsbad/USA)
Hepes	Biomol (Hamburg/D)
Hygromycin	Applichem (Darmstadt/D/D)
Imidazol	Roth (Karlsruhe/D)
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe/D)
LB medium (Luria/Miller)	Roth (Karlsruhe/D)
Ligand GR42, GR44, GR3a1 und GR3e*	Dr. R. Gopalakrishnan (MPI of Psychiatry, Munich)[156, 157]
Ligand YW544, YW691 und YW703	Dr. Y. Wang (MPI of Psychiatry, Munich)
Ligand LDC43920, SG466, SG537 und SG568	Dr. S. Gaali (MPI of Psychiatry, Munich) Lead Discovery Center (Dormund)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe/D)
Lipofectamine LTX	Invitrogen (Karlsruhe/D)
Lumasafe (Scintillationscocktail)	Perkin Elmer (Waltham/USA)
Luminol	Roth (Karlsruhe/D)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt/D)

2. Material

Methanol	Roth (Karlsruhe/D)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt/D)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe/D)
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Neurobasal Medium	Gibco (Carlsbad/USA)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Opti-MEM	Gibco (Carlsbad/USA)
PageRuler™ Plus prestained Proteinmarker	Fermentas (St.Leon-Rot/D)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Molekula (Nienburg/Weser/D)
Poly-L-Lysin (1 mg/ml)	Merck-Millipore (Billerica/USA)
Ponceau S	Roth (Karlsruhe/D)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Rapamycin (Lot #R020)	Cfm (Marktredwitz/D)
N-(N',N'-dimethyl-carboxamidomethyl)cycloheximid	Dr. R. Gopalakrishnan (MPI of Psychiatry, Munich)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe/D)
Natriumdesoxycholat	Roth (Karlsruhe/D)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe/D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck-Millipore (Billerica/USA)
Natriumfluorid	Roth (Karlsruhe/D)
Natriumdihydrogenorthovanadate	Fluka Sigma-Aldrich (St.Louis/USA)
Natriumpyrophosphate	Fluka Sigma-Aldrich (St.Louis/USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Roth (Karlsruhe/D)
Radicol	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Ru28318	AG Schmidt (MPI für Psychiatrie /D)
Ru26988	AG Schmidt (MPI für Psychiatrie /D)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt/D)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe/D)
Trypsin/EDTA 0,25 %	Gibco (Carlsbad/USA)
Tween 20	Bio-Rad (München/D)
Vectashield Mounting Media (inklusive DAPI)	Vector (Burlingame/USA)
β – Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt/D)

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

2.2 Verbrauchsmaterial

1,5ml Reaktionsgefäße Protein low binding	Eppendorf (Hamburg/D)
Assay Platte 96 well low binding	Corning (Corning/USA)
Assay Platte 96 well „opitiplate“ (6004290)	Perkin Elmer (Waltham/USA)
Deckgläser	Thermo Fischer Scientific (Schwerte/D)
Millex Stringe Filter 0.22 µm	Merck-Millipore (Billerica/USA)
Nitrocellulose membrane Protran BA83	Roth (Karlsruhe/D)
Objektrträger	Thermo Fischer Scientific (Schwerte/D)
PCR Strips 0,2ml	Sarstedt (Nümbrech/D)
Pipettenspitzen	Corning (Kaiserslautern/D)
Rotilabo Blotting Papier	Carl Roth (Karlsruhe/D)
Scinitillationvials	Perkin Elmer (Waltham/USA)
SDS Mini Gel Kassetten	Invitrogen (Karlsruhe/D)
Sterilfilter Express™ Plus 0,22µm	Millipore (Billerica/USA)
Sterilfilter Millex® -FG	Millipore (Billerica/USA)
Zellkulturflaschen	Nunc (New York/USA)
Zellkulturschalen	Nunc (New York/USA)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrech/D)

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

2.3 Enzyme

Humanes FKBP51 (hFKBP51)	20 mM HEPES pH 8.0, 20 mM NaCl, 10 % Glycerol
hFKBP51TPRmut (FKBP51K352A/R356A)	20 mM HEPES pH 8.0, 20 mM NaCl, 10 % Glycerol
hFKBP51deltaFK1 (FKBP51: AA 143-457)	20 mM HEPES pH 8.0, 20 mM NaCl, 10 % Glycerol
hFKBP51FK1 (FKBP51: AA 1 – 140)	20 mM HEPES pH 8.0, 20 mM NaCl, 10 % Glycerol
Humanes FKBP52 (hFKBP52)	20 mM HEPES pH 8.0, 20 mM NaCl, 10 % Glycerol
hFKBP52TPRmut (FKBP52K354A)	20 mM HEPES pH 8.0, 20 mM NaCl, 10 % Glycerol
Squirrel Monkey FKBP51 (smFKBP51)	20 mM HEPES pH 8.0, 20 mM NaCl, 10 % Glycerol

Tabelle 4: In BL21 E.Coli exprimierte und in-vitro aufgereinigte Proteine samt Lagerpuffer

Immunoglobulin G	Thermo Fischer Scientific (Schwerte/D)
Lysozym	Roth (Karlsruhe/D)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Frankfurt am Main/D)
Phusion High Fidelity Taq Polymerase	NEB (Frankfurt am Main/D)
T4-DNA Ligase	NEB (Frankfurt am Main/D)
Taq Polymerase	NEB (Frankfurt am Main/D)

Tabelle 5: Enzyme für biotechnologische Prozessierungen

α -GFP, polyklonal, Huhn Katalognummer: ab13970	Abcam (Cambridge/UK)
α -GR, polyclonal, Kanninchen Katalognummer: sc-1002	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz/USA)
α -HA, monoklonal, Maus Katalognummer: MMS-101P	Covance (Princeton/USA)
α -HA-HRP, monoklonal, Ratte Katalognummer: 12013819001	Roche (Basel/Schweiz)
α -Huhn, Ziege, Alexa Fluor 488 gekoppelt Katalognummer: A-11039	Life Technologies (Carlsbad/USA)
α -Kanninchen, polyklonal, Ziege, Katalognummer: ab1265	Abcam (Cambridge/UK)
α -Maus, Ziege, Alexa Fluor 594 gekoppelt Katalognummer: A-11032	Life Technologies (Carlsbad/USA)

Tabelle 6: Antikörper

2.4 Plasmide

Name	Nr.	Quelle	Verwendet für
pRK5	32	AG Rein (MPI für Psychiatrie/D)	Kontrollvektor Neuriten-Wachstums-Assay
pProExHTa	1	Invitrogen (Karlsruhe/D)	Expressionsvektor für Proteine
pRK5-FKBP51	207	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	FKBP51 Expression in Neuriten-Wachstums-Assay
pRK5-FKBP52	206	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	FKBP52 Expression in Neuriten-Wachstums-Assay
pRK5-smFKBP51	413	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	smFKBP51 Expression in Neuriten-Wachstums-Assay
pRK5-mmFKBP51	499	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	mmFKBP51 Expression in Neuriten-Wachstums-Assay
pRK5-FKBP51F67V	372	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	FKBP51F67V Expression in Neuriten-Wachstums-Assay
pRK5-FKBP51FD67DV	382	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	FKBP51FD67DV Expression in Neuriten-Wachstums-Assay
pRK5-FKBP51TPRmut (FKBP51K352A/R356A)	302	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	FKBP51TPRmut Expression in Neuriten-Wachstums-Assay
pProExHTa-FKBP51	2	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	FKBP51 Expression in BL21 für Aufreinigung
pProExHTa-FKBP52	3	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	FKBP52 Expression in BL21 für Aufreinigung
pProExHTa-FKBP51TPRmut (FKBP51K352A/R356A)	HG77	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	FKBP51TPRmut Expression in BL21 für Aufreinigung
pProExHTa-hFKBP51deltaFK1 (FKBP51: AA 143-457)	387	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	FKBP51deltaFK1 Expression in BL21 für Aufreinigung
pProExHTa-hFKBP51FK1 (FKBP51: AA 1 – 140)	512	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	Expression der FKBP51FK1-Domäne in BL21 für Aufreinigung
pProExHTa-hFKBP52TPRmut (FKBP52K354A)	132	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	FKBP52TPRmut Expression in BL21 für Aufreinigung
pProExHTa-smFKBP51	440	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	smFKBP51 Expression in BL21 für Aufreinigung
pProExHTa-mmFKBP51	470	AG Hausch (MPI für Psychiatrie/D)	mmFKBP51 Expression in BL21 für Aufreinigung
myr-Venus	455	AG Refojo (MPI für Psychiatrie/D)	Expression von myrsitinierten Venus in Neuriten-Wachstums-Assay

Tabelle 7: Plasmide

2.5 Primer

Nr.	Name	Sequenz 5' - 3'	Verwendet für	Komplementär
22	seq TAC-profor	GTGTGGAATTGTGAGCGGATA AC	Sequenzierung von mcs des pProExHTa	pProExHTa
23	seq pBAD-3'	ATCTGTATCAGGCTGAAAATC	Sequenzierung von mcs des pProExHTa	pProExHTa
34	51mut_f66v_f	GTCAAATGGAAAGAAGGTTGA TTCCAGTCATGATAGAAATGAA CC	Punktmutation (F67V) in humanem FKBP51	Humanes FKBP51
35	51mut_f66v_r	GGTTCATTTCTATCATGACTGG AATCAACCTTCTTTCCATTTGAC	Punktmutation (F67V) in humanem FKBP51	Humanes FKBP51
36	52mut_f66v_f	CTATTAGATGGCACAAAGGTTG ACTCCAGTCTGGATCG	Punktmutation (F67V) in humanem FKBP52	Humanes FKBP52
37	52mut_f66v_r	CGATCCAGACTGGAGTCAACCT TTGTGCCATCTAATAG	Punktmutation (F67V) in humanem FKBP52	Humanes FKBP52
130	SP6 Seq	ATTTAGGTGACACTATAG	Sequenzierung von mcs des pRK5	pRK5
131	pSG5rv Seq	GAAATTTGTGATGCTATTGC	Sequenzierung von mcs des pRK5	pRK5
249	51-PPI mut-fwd	GGAAAATTGTCAAATGGAAAG AAGGATGTTTCCAGTCATGATA GAAATGAACCATTTG	Punktmutation (FD67DV) in humanem FKBP51	Humanes FKBP51
259	51-PPI mut-rev	CAAATGGTTCATTTCTATCATGA CTGGAAACATCCTTCTTTCCATT TGACAATTTTCC	Punktmutati on (FD67DV) in humanem FKBP51	Humanes FKBP51
259	pm-smFKBP51-fwd	CGACAGTTCCTACTTATAAG ACAATGACTACTG	Punktmutation in FKBP51 aus <i>sameri boliviensis</i>	FKBP51 aus <i>sameri boliviensis</i>
260	pm-smFKBP51-rev	CAGTAGTCATTGTCTTATAAGT AGAGAACCTGTCTG	Punktmutation in FKBP51 aus <i>sameri boliviensis</i>	FKBP51 aus <i>sameri boliviensis</i>
287	sm51F67V_for	GGCAAATGGAAAGAAGGTGGA TTCCAGTCATGATAG	Punktmutation (F67V) in FKBP51 aus <i>sameri boliviensis</i>	FKBP51 aus <i>sameri boliviensis</i>
288	sm51F67V_rev	CTATCATGACTGGAATCCACCTT CTTTCCATTTGCC	Punktmutation (F67V) in FKBP51 aus <i>sameri boliviensis</i>	FKBP51 aus <i>sameri boliviensis</i>
289	sm51FD67DV_for	GGCAAATGGAAAGAAGGATGT GTCCAGTCATGATAG	Punktmutation (FD67DV) in FKBP51 aus <i>sameri boliviensis</i>	FKBP51 aus <i>sameri boliviensis</i>

Tabelle 8: Primer

2.6 Viren

Name	Quelle	Verwendet für
AAV1/2-CAG-eGFP-WPRE-BGH-polyA	GeneDetect (Auckland/Neuseeland)	eGFP exprimierender Kontrollvirus für Neuriten-Wachstums-Assay in primären hippocampalen Neuronen
AAV1/2-CAG-HA-tagged-FKBP51-WPRE-BGH-polyA	GeneDetect (Auckland/Neuseeland)	Überexpression von FKBP51 in primären hippocampalen Neuronen für Neuriten-Wachstums-Assay
AAV1/2-CAG-HA-tagged-FKBP51-F67Vmutant-WPRE-BGH-polyA	GeneDetect (Auckland/Neuseeland)	Überexpression von FKBP51F67V in primären hippocampalen Neuronen für Neuriten-Wachstums-Assay

Tabelle 9: Viren

2.7 Geräte

ÄKTApurifier	GE Healthcare (München/D)
Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen/D)
Micro Beta ² 2450 Microplate Scintillation Counter	Perkin Elmer (Waltham/USA)
Balance 40SM-200A	Precisa (Dietiken/Schweiz)
Biofuge <i>pico</i>	Heraeus (Buckinghamshire/UK)
ChemiDoc™ MP imaging System	Bio-Rad (München/D)
CO2 Inkubator Hera Cell	Fisher Thermo (Schwerte/D)
DU® 530 UV/VIS Spectrophotometer	Beckman Coulter (Krefeld/D)
Eismaschine ZBE 150-MT	Ziegen (Isenhagen/D)
Electrophorese Power Supply	GE Healthcare (München/D)
Gelelectrophorese System XCell Sure Lock	Invitrogen (Karlsruhe/D)
GENiosPro	Tecan (Männedorf/Schweiz)
LS6500 Multit-purpose Scintillation Counter	Beckman Coulter (Krefeld/D)
Neubauer Zählkammer	Digital Bio
pH-meter 538 Multical®	WTW (Weilheim/D)
Pipettor Pipetus akku	Hirschmann (Eberstadt/D)
Robocycler 96	Stratagene (La Jolla/USA)
Superdex 75 (HiLoad 16/600)	GE Healthcare (München/D)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg/D)
Vortexer Mini Shaker MS2	IKA Labortechnik (Staufen/D)
Work bench LaminarAir HB 2448	Heraeus (Mannheim/D)
Zentrifuge 3K12 (Rotor:11223)	Sigma (Osterode am Harz/D)
Zentrifuge 5417	Eppendorf (Hamburg/D)
Zentrifuge 6K15 (Rotor: 12256)	Sigma (Osterode am Harz/D)
Zentrifuge Avanti™ J-25 (Rotoren: JA20/JLA250)	Beckman Coulter (Krefeld/D)
Zentrifuge L7-65 Ultrazentrifuge (Rotor: TI70)	Beckman Coulter (Krefeld/D)
Zentrifuge Magafuge 1.0R	Heraeus (Buckinghamshire/UK)

Tabelle 10: Geräte

2.8 Bakterien und eukaryotische Zellkultur

Name	Quelle	Verwendet für
AXGR16 (human) GR überexprimierend	Baastian Hoogeland (MPI für Psychiatrie/D)	Herstellung GR-haltiger Zelllysate für den Radioaktiv-Bindungsassay
BL21 (E. coli)	Invitrogen (Karlsruhe/D)	Überexpression von Proteinen für <i>in- vitro</i> Aufreinigung
DH5- α (E. coli)	Invitrogen (Karlsruhe/D)	Vervielfältigung von DNS-Konstrukten
Flp-In-293 (human)	Invitrogen (Karlsruhe/D)	Herstellung stabil überexprimierender Zellen eines bestimmten Proteins
HEK293 (human)	Invitrogen (Karlsruhe/D)	Kontrollzellen für AXGR16-Zellen
Neuro-2a (murin)	AG Refojo (MPI für Psychiatrie/D)	Neuriten-Wachstums-Assay
Primäre hippocampale Neuronen	Selbstständig präpariert aus C57/Bl6- Mäuseembryonen (E18)	Neuriten-Wachstums-Assay

Tabelle 11: Zelllinien

2.9 Kits

BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific (Schwerte/D)
High Yield PCR Clean-up/Gel Extraction Kit	SLG (Gauting/D)
High Yield Plasmid Mini Kit	SLG (Gauting/D)
Nuceobond AX 2000 Kit	Macherey-Nagel (Düren/D)
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden/D)

Tabelle 12: Kits

2.10 Software

AxioVision 4.7.1	Carl Zeiss (Oberkochen/D)
Endnote X6	Thomson Reuters (New York/USA)
ImageLab 4.1	Bio-Rad (München/D)
ImageJ	NIH (Bethesda/USA)
SigmaPlot 11	Systat Software (Erkrath/D)
Protein Calculator v3.3	Scripps Research Institute (La Jolla/USA)
Word, Excel 2010	Microsoft (München/D)

Tabelle 13: Software

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Präparation kompetenter *E. Coli*-Bakterien

Für die Präparation von transformations-kompetenten *E. Coli*-Bakterien wurden 50 ml steriles LB-Medium mit 50 µl des Glycerol-Stocks angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler kultiviert (200 rpm). 25 ml dieser Kultur wurden im Anschluss in 500 ml steriles LB-Medium gegeben und bei 37 °C so lange kultiviert, bis die optische Dichte bei 600 nm einen Wert von 0,3 erreichte. Die Zellen wurden daraufhin durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 5000 g und 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde zunächst langsam in 125 ml kalter, steriler MgCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erneut in 25 ml steriler CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Anschließend wurden 200 ml der gleichen Lösung zugegeben und für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abermals bei 4000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und im Anschluss mit 10 ml einer 100 mM CaCl₂-Lösung, welche 10 Prozent Glycerol enthielt, resuspendiert, zu 100 µl aliquotiert und bei – 80 °C gelagert.

3.1.2 Transformation

50 µl kompetente *E. Coli*-Bakterien wurden aufgetaut und mit 5 - 50 ng DNS versetzt. Im Anschluss wurden die Proben für eine halbe Stunde auf Eis gelagert und daraufhin 45 Sekunden bei 42 °C inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen weitere zwei Minuten auf Eis gehalten, woraufhin 900 µl LB-Medium zugegeben wurde. Nun wurden die Zellen für weitere 30 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert und zum Abschluss abzentrifugiert und auf LB-Agar-Platten, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden einzelne Klone gepickt und auf separaten LB-Agar-Platten ausgestrichen und analysiert.

3.1.3 Bakterien-Kulturen

Ein dem jeweiligen Versuch entsprechendes Volumen an LB-Medium wurde mit einem singulär gepickten Klon einer LB-Agar-Platte oder einer geringen Menge eines Glycerol-Stocks über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung des eingesetzten Glycerol-Stocks wurden 500 µl der Kultur mit 500 µl 30-prozentigem, sterilen Glycerol versetzt und bei - 80 °C eingefroren.

3.1.4 Präparation von DNS und deren Quantifizierung

DNS wurde mit Hilfe eines entsprechenden Kits nach Herstellerangaben präpariert und die Konzentration durch Bestimmung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich die gemessenen Werte in einem linearen Bereich zwischen 0,1 und 1 befanden. Im Anschluss konnte mittels Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration bestimmt werden:

$$A = e * c * d$$

A: Absorption

C: Konzentration

e: molarer Extinktionskoeffizient

d: Strahlengang in der Küvette

Für doppelsträngige DNS gilt: $A_{260} = 1$ entspricht einer 50 ng/ μ l haltigen DNS-Lösung bei einem pH von 7,0.

3.1.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für eine Standard-Polymerase-Kettenreaktion wurden in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß, in einem Totalvolumen von 50 µl, folgende Komponenten zusammengegeben:

dNTP-Mix (Stock: 25 mM):	500 µM
Primer 1 „forward“:	100 nM
Primer 2 „reverse“:	100 nM
Zu amplifizierende DNS:	100 ng
Phusion Polymerase:	1 U
MgCl ₂ :	2 mM
10 fach Polymerasen Puffer:	5 µl

Anschließend wurde die Reaktion in einen Thermo-Cycler gegeben und einem vorgegebenen Reaktionsprogramm unterzogen. Hierfür wurde für je 1000 Basenpaare eine Elongationszeit von einer Minute kalkuliert. Die Anlagerungstemperatur wurde nach Herstellerangaben der Primer gewählt. So ergab sich ein komplettes Reaktionsprogramm, das sich wie folgt zusammensetzte:

Schritt 1:	92 °C	300 Sekunden	Initiale Denaturierung
Schritt 2:	92 °C	40 Sekunden	Denaturierung
Schritt 3:	50 – 65 °C	40 Sekunden	Annäherung
Schritt 4:	72 °C	30 -120 Sekunden	Elongation
Schritt 5:	30-fache Wiederholung der Schritte 2 bis 4		
Schritt 6:	72 °C	300 Sekunden	finale Elongation

3.1.6 Aufreinigung und Analyse von PCR-Produkten

3.1.6.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die Größe verschiedener DNS-Fragmente ist mit Hilfe von Agarosegelen bestimmt worden. Hierfür wurde die DNS – üblicherweise 5 µl einer 100 ng/µl Lösung – auf ein solches Gel aufgetragen und an eine Spannungsquelle (100 V) angeschlossen, um eine Bewegung der geladenen DNS in Richtung der Anode zu ermöglichen. Die Trennung basierte dabei auf der Größe der DNS-Fragmente, da kleinere Bruchstücke im Spannungsfeld schneller wandern als größere.

Zur Durchführung des Experiments wurden einprozentige Agarosegele verwendet, die aus je 1 g Agarose und 100 ml TAE-Puffer bestanden. Diese Lösung wurde in einer Mikrowelle erhitzt und so lange geschwenkt, bis sich die Agarose komplett löste. Zu diesem Zweck musste die Lösung mehrmals zum Sieden gebracht werden. Nachdem sich die Agarose vollständig gelöst hatte, ruhte die Lösung zum Abkühlen einige Minuten. Erkaltet, aber noch flüssig wurde sie mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml in Wasser) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die Taschen wurden mit Hilfe von Kämmen geformt. Nachdem die Lösung innerhalb der Kammern komplett abgekühlt und erstarrt war, konnte das Gel verwendet werden. Die zu untersuchenden DNS-Lösungen wurden vorsichtig in die vorgeformten Taschen gefüllt und mittels des elektrischen Feldes getrennt.

TAE-Puffer: Tris/HCl 40 mM, Eisessig 20 mM, EDTA 1 mM

DNS-Auftragspuffer: EDTA 20 mM, Bromphenolblau 0,25 %, Saccharose 40 %, pH 8,0

3.1.6.2 Aufreinigung von DNS

Die Aufreinigung der DNS aus PCR- oder Restriktionsansätzen sowie jener, die mit Hilfe eines präparativen Agarosegels aufgetrennt worden war, erfolgte je nach Bedarf der zu präparierenden Menge mit dem High-Yield-PCR-Clean-up/Gel-Extraction-Kit der Firma SLG (Gauting/D) oder mit dem Nucleobond-AX-2000-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren/D). Es wurde jeweils exakt nach Angaben des Herstellers verfahren.

3.1.6.3 Isolierung von DNS-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die zu isolierenden DNS-Fragmente wurden zunächst mit Hilfe eines Agarosegels getrennt und anschließend per UV-Licht sichtbar gemacht. Daraufhin wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers mit dem High-Yield-PCR-Clean-up/Gel-Extraction-Kit der Firma SLG (Gauting/D) aufgereinigt. Die Quantifizierung der DNS wurde mittels der in Kapitel 3.1.4 aufgeführten Methode umgesetzt.

3.1.6.4 Restriktion von DNS

Für die Restriktion von Plasmid-DNS sowie von PCR-Produkten wurde folgender Ansatz gewählt:

1 µg	Plasmid-DNS
10 U	Restriktionsenzym 1
10 U	Restriktionsenzym 2
2 µl	BSA (10-fach Stock)
2 µl	Puffer für entsprechende Restriktionsenzyme (10-fach Stock)
X µl	H ₂ O bidest

Totalvolumen 20 µl

Die Ansätze wurden im Anschluss 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Restriktion wurde die DNS mit Hilfe des High-Yield-PCR-Clean-up/Gel-Extraction-Kit der Firma SLG (Gauting/D) aufgereinigt. Im Falle der Restriktion von Plasmid-DNS wurde diese zuvor über ein Agarosegel aufgereinigt, die benötigten DNS-Fragmente wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht, ausgeschnitten und im Anschluss selbiger Restriktionsprozedur unterzogen.

3.1.6.5 Ligation von DNS

Zur Umsetzung von Ligationen wurde den obigen Ausführungen entsprechend prozessierte Plasmid-DNS mit einem PCR-Produkt oder dem Insert eines anderen Vektors in einem Verhältnis von 1 zu 10 (Insert zu Vektor) kombiniert und in folgendem Ansatz zusammen mit T4-DNS-Ligase über Nacht bei 16 °C inkubiert:

1 µg	Plasmid-DNS
6 µg	PCR-Produkt oder korrekt geschnittenes Insert aus einem anderen Vektor
10 U	T4 DNS-Ligase (20 U/µl)
1 mM	ATP
1 µl	Ligationspuffer (10 fach Stock)

Totalvolumen 10 µl

3.1.6.6 Restriktionskontrollen

Um zu überprüfen, ob die gewünschte Klonierung erfolgreich verlaufen war, wurden stets Restriktionskontrollen durchgeführt. Hierbei kamen die während der Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme zum Einsatz. Der Ansatz besagter Restriktionskontrollen setzte sich wie folgt zusammen:

1 µg	Plasmid-DNS
10 U	Restriktionsenzym 1
10 U	Restriktionsenzym 2
2 µl	Puffer für entsprechende Restriktionsenzyme (10-fach Stock)
X µl	H ₂ O bidest

Totalvolumen 20 µl

Die Ansätze wurden im Anschluss 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und mit Hilfe von Agarosegelen auf ihren Erfolg hin analysiert.

3.1.6.7 DNS-Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob eine durchgeführte Klonierung erfolgreich verlief, wurde nach korrekter Restriktionskontrolle eine komplette Sequenzierung des eingefügten Inserts vollzogen. Hierfür wurde stets 300 ng Plasmid-DNS zusammen mit den entsprechenden Primern 1 und 2 (*forward*- und *reverse*-Primer) in einem Totalvolumen von 7,5 µl an die Microchemistry Core Facility des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried/D versendet und dort sequenziert. Die dort generierten DNS-Sequenzen wurden im Anschluss mit korrekten, korrespondierenden Sequenzen der NCBI-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*-Datenbank) verglichen und verifiziert.

3.1.6.8 Punktmutationen durch PCR

Um Punktmutationen in bestimmte Bereich der Plasmid-DNS einzuführen, wurde ein Verfahren angewandt, welches unter anderem die in Kapitel 3.1.5 beschriebene Polymerase-Kettenreaktion miteinbezieht (*Site-directed mutagenesis*). Hierfür wurde folgender Ansatz mit einem Totalvolumen von 50 µl gewählt:

dNTP-Mix (Stock: 25 mM):	250 µM
Primer 1 „forward“:	100 nM
Primer 2 „reverse“:	100 nM
Zu amplifizierende DNS:	100 ng
Polymerase:	1 U
10 fach Polymerasen Puffer:	5 µl

Die Primer wurden hierbei so gewählt, dass die gewünschte Punktmutation in den Sequenzen enthalten war und von mindestens 15 Basen zu beiden Seiten flankiert wurde. Anschließend wurde die Reaktion in einen Thermo-Cycler gegeben und einem vorgegebenen Reaktionsprogramm unterzogen. Hierfür wurde für je 1000 Basenpaare des kompletten Vektors eine Elongationszeit von einer Minute kalkuliert. Die Anlagerungstemperatur wurde nach Herstellerangaben der Primer gewählt. So ergab sich ein komplettes Reaktionsprogramm, das sich wie folgt zusammensetzte:

Schritt 1:	92 °C	300 Sekunden	Initiale Denaturierung
Schritt 2:	92 °C	40 Sekunden	Denaturierung

3. Methoden

Schritt 3:	50 – 65 °C	40 Sekunden	Annäherung
Schritt 4:	72 °C	ca. 480 Sekunden (s.o.)	Elongation
Schritt 5:	20-fache Wiederholung der Schritte 2 bis 4		
Schritt 6:	72 °C	600 Sekunden	finale Elongation

Nach abgeschlossener PCR wurde der gesamte Ansatz einem Verdau mit DpnI unterzogen. Dieses Enzym dient dem Abbau von methylierter DNS, sodass nur die Ursprungs-DNS ohne Mutation, nicht jedoch die neu synthetisierte DNS inklusive der gewünschten Punktmutation, abgebaut wird. Hierfür wurden 1 µl DpnI (20 U/µl) direkt in den PCR-Ansatz gegeben, der eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurde. Daraufhin wurde das Enzym durch einen 10-minütigen Hitzeschock bei 80 °C inaktiviert. Nachfolgend wurde der Ansatz in kompetente *E. Coli* transformiert (siehe Kapitel 3.1.2). Am darauffolgenden Tag wurden einzelne Kolonien gepickt, deren Plasmide extrahiert und sequenziert (siehe Kapitel 3.1.3, 3.1.4, und Kapitel 3.1.6.7).

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Expression und Aufreinigung von Proteinen

3.2.1.1 Proteininduktion mit IPTG

Um Proteine den experimentellen Anforderungen entsprechend aufzureinigen zu können, mussten sie molekularbiologisch derart modifiziert werden, dass sie schlussendlich einen N-terminalen sechsfachen Histidin-Rest in sich trugen (siehe Kapitel 3.1). Anschließend konnte das kodierende Plasmid in *E. coli* (Typ BL21) transformiert werden, um daraufhin dort exprimiert zu werden. Zunächst wurde zu diesem Zweck eine 500 ml Übernacht-Kultur in sterilem LB-Medium angeimpft. Am nächsten Tag wurde diese in drei Litern LB-Medium so weit verdünnt, dass die messbare optische Dichte bei 600 nm einem Wert von 0,1 entsprach. Anschließend wurde die Bakterienkultur auf einem Kreisschüttler bei 37 °C inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm 0,5 betrug. Da die zu exprimierenden Proteine stets in den pProExHTa-Vektor der Firma Invitrogen (Karlsruhe/D) kloniert wurden, konnten besagte Proteine anschließend mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden. Dies geschah nach Erreichen der OD₆₀₀ von 0,5 mit 600 μM IPTG. Nach dreistündiger Induktion wurden die Zellen schließlich abzentrifugiert (4400 g, 4 °C für 15 Minuten).

3.2.1.2 Zellyse

Die folgenden Aufreinigungsschritte wurden stets bei 4 °C durchgeführt: Das aus der Proteininduktion mit IPTG erhaltene Zell-Pellet wurde zur weiteren Aufreinigung in 50 ml Lyse-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die Zellen sonifiziert. Dies geschah unter Hinzuziehung eines Ultraschall-Desintegrators 450 der Firma Branson (Dietzenbach-Steinberg/D). Dabei wurden 15 Zyklen, mit jeweils 12 Sekunden andauernden Ultraschall-Impulsen der Stufe 5 und 18 sekündiger Pause, durchlaufen. Nach Aufschluss der Zellen wurde die Lösung abermals zentrifugiert, um nicht benötigte Zelltrümmer abzutrennen (15000 g, 4 °C für 40 Minuten). Der Überstand wurde im Anschluss weiterprozessiert.

Lyse-Puffer: HEPES 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, Imidazol 40 mM, PMSF 1 mM
und 1 mg/ml Lysozym

3.2.1.3 *Aufreinigung von Proteinen mittels Ni-NTA Agarose*

Im Fortgang der Aufreinigung wurden 5 ml Nickel-NTA Agarose der Firma Qiagen (Hilden/D) in 50 ml Wasch-Puffer resuspendiert und durch Zentrifugation pelletiert (700 g bei 4 °C). Anschließend wurde das Zellysate zugegeben und für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Nun wurde die Agarose erneut pelletiert (700g bei 4 °C) und insgesamt zweimal mit jeweils 50 ml Wasch-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde entsorgt und die an die Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteine wurden mit 5 ml Elutionspuffer eluiert. Die gesamte Elution wurde jeweils in 0,5 ml Elutionsfraktionen aufgefangen. Von den jeweiligen Fraktionen wurden jeweils 20 µl abgenommen und mit 100 µl Bradfordreagenz in einer 96-Well-Platte auf Proteine hin untersucht. Diese waren an einer deutlichen Blaufärbung zu erkennen, die durch Verwendung eines Photometers quantifiziert werden konnte. Positive Fraktionen wurden daraufhin zusammengeführt und für eine mögliche weitere Aufreinigung bei 4 °C aufbewahrt.

Nach der Aufreinigung wurde eine SDS-Gelelektrophorese (siehe auch 3.2.2) durchgeführt um die Reinheit der gewonnenen Proteine zu überprüfen. War im Anschluss einer Coomassie-Färbung auf dem Gel lediglich das gewünschte Protein zu sehen, so wurde es in Protein-Lagerpuffer dialysiert und bei -80 °C eingefroren und für spätere Verwendungen aufbewahrt. Waren neben dem gewünschten Protein jedoch noch weitere Banden beziehungsweise Verunreinigungen erkennbar, so wurde eine weitere Aufreinigung mittels Gel-Permeations-Chromatographie durchgeführt.

Wasch-Puffer: HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 20 mM, Imidazol 40 mM, Glycerol 5 %
Elutions-Puffer: HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 20 mM, Imidazol 400 mM, Glycerol 5 %
Protein-Lagerpuffer: HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 20 mM, Glycerol 10 %

3.2.1.4 *Dialyse aufgereinigter Proteine*

Um alle aufgereinigten Proteine in einem identischen Puffersystem vorliegen zu haben, wurden diese nach erfolgreich abgeschlossener Reinigung mit Hilfe von Slide-A-Lyzer-Dialysier-Instrumenten der Firma Pierce/Fisher Thermo Scientific (Bonn/D) gegen Protein-Lagerpuffer dialysiert. Dies geschah über Nacht bei 4 °C, wobei mindestens zwei Liter Protein-Lagerpuffer pro 2 ml Protein-Lösung eingesetzt wurden. Am Folgetag wurde der Puffer gewechselt und die Protein-Lösung für weitere sechs Stunden dialysiert.

Protein-Lagerpuffer: HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 20 mM, Glycerol 10 %

3.2.1.5 *Aufreinigung von Proteinen mittels Gel-Permeations-Chromatographie*

Um Proteine nach erfolgter Reinigung über Ni-NTA-Agarose gegebenenfalls noch intensiver aufzureinigen, wurden diese einer Trennung mittels Gel-Permeations-Chromatographie unterzogen. Hierfür wurde ein ÄKTApurifier in Kombination mit einer HiLoad 16/60 Superdex 75 Trennsäule der Firma GE Healthcare (München/D) verwendet. Das Gel-Filtrations-System wurde zunächst mit 2 Säulenvolumen Lauf-Puffer äquilibriert. Nun wurden die in Kapitel 3.2.1.3 gesammelten Elutionsfraktionen in das System injiziert und mit einer Flußrate von 0,5 ml/min und einem maximalen Druck von 0,5 mPa getrennt. Es wurden stets 0,5 ml Fraktionen gesammelt und jede Fraktion wurde durch SDS-PAGE und einer Coomassie-Färbung auf ihren Proteingehalt hin überprüft. Jene Fraktionen, in denen das gewünschte Protein singulär vorhanden war, wurden vereinigt und bei -80 °C für die weitere Verwendung aufbewahrt.

Lauf-Puffer: HEPES 20 mM pH 8.0, NaCl 20 mM, Glycerol 10 %

3.2.2 Analyse aufgereinigter Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.2.2.1 Präparation von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Für die Präparation von SDS-Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAA-Gelen) wurde ein Gelsystem der Firma Invitrogen (Karlsruhe/D) in Anspruch genommen. Die dazugehörigen Kassetten wurden abhängig von der benötigten Konzentration der Gele mit folgenden Lösungen befüllt:

Finale Konzentration	Acrylamid Lösung	H ₂ O bidest.	TEMED	1 M Tris, pH 8.8	10% SDS	10 % APS
10%	4.7 ml	3.9 ml	17 µl	5.4 ml	140 µl	85 µl
12%	5.7 ml	3.0 ml	17 µl	5.4 ml	140 µl	85 µl
16%	7.6 ml	1 ml	17 µl	5.4 ml	140 µl	85 µl

Tabelle 14: Trenngel-Lösungen für die Herstellung von zwei SDS-Polyacrylamid-Gelen

Es wurde im Anschluss so lange gewartet, bis die Lösungen komplett polymerisiert waren. Danach wurde das Sammel-Gel gegossen, ein Kamm hinzugefügt, sodass sich Taschen bilden konnten, und auch dessen Polymerisation abgewartet. Zur Initiierung der Polymerisation wurden TEMED und APS verwendet, welche stets als letzte Komponenten hinzugegeben wurden.

SDS-Laufpuffer: Tris/HCl 25 mM pH 8.3, Glycin 250 mM, SDS 0,1 %

SDS-Proben-Puffer (zweifach): Tris/HCl 125 mM, 2-Mercaptoethanol 10 %, SDS 4 %, Bromphenol Blau 0,004 %

Trenn-Gel: Tris/HCl 380 mM pH 8,8, Natriumdodecylsulfat 0,1 %, Acrylamid 5 %, Bisacrylamid 0,2 – 0,3 %
TEMED 0,2%, Ammoniumperoxodisulfat 0,06%

Sammel-Gel: Tris/HCl 375 mM pH 6.8, Natriumdodecylsulfat 0,1 %, Acrylamid 10-16 %, Bisacrylamid 0,2 – 0,3 %
TEMED 0,2 %, Ammoniumperoxodisulfat 0,06 %

Coomassiefarbe-Lösung: Ethanol 40 %, Essigsäure 10 %, Coomassie-Brilliant-Blau 0,01 %

Coomassieentfärbelösung: Ethanol 40 %, Essigsäure 10 %

3.2.2.2 *Präparation der Proben und elektrophoretische Auftrennung*

Protein-Proben, die mit Hilfe von SDS-PAGE untersucht werden sollten, wurden in SDS-Proben-Puffer (siehe Kapitel 3.2.2.1) gelöst und bei 95 °C für fünf Minuten erhitzt. Die Proben wurden daraufhin in einem Vortex geschüttelt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Um anschließend eine Trennung der Proben zu erreichen, wurden sie im Gel mit Hilfe des XCell SureLock Gel Systems und des Mini-Cell Elektrophorese Systems der Firma Invitrogen (Karlsruhe/D) mit einer konstanten Stromstärke von 25 mA getrennt. Als nächstes wurden die Proteine entweder per Coomassie-Färbung des Gels sichtbar gemacht oder direkt auf Nitrozellulose geblottet. Im Falle der Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau wurde das Gel mit der in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Färbelösung für 30 Minuten auf einem Kreisschüttler inkubiert. Danach wurde das Gel mit der Coomassie-Entfärbelösung solange behandelt, bis die Proteine anhand ihrer Blaufärbung deutlich zu erkennen waren. Die alternative Möglichkeit des Transfers auf Nitrozellulose und der anschließenden Detektion der Proteine durch Immunoblotting ist dem Kapitel 3.3.4 zu entnehmen.

3.2.3 Bestimmung der Protein Konzentration

3.2.3.1 *Quantifizierung mittels UV Absorption*

Die Existenz aromatischer Aminosäuren ermöglicht es, Proteine anhand ihrer Absorption von Licht, welches eine Wellenlänge von 280 nm hat, zu quantifizieren. Hierbei liefert abermals das Lambert-Beersche Gesetz eine Verbindung zwischen der Konzentration einer gegebenen Proteinlösung und der Lichtabsorption:

$$A = e * c * d$$

A: Absorption

e: molarer Extinktionskoeffizient

d: Strahlengang in der Küvette

Der molare Extinktionskoeffizient kann durch eine Mengenangabe der im Protein enthaltenen aromatischen Aminosäuren kalkuliert werden. Für eine Quantifizierung per UV wurden die Proteinlösungen unter der Verwendung eines Photometers der Firma Beckman (Krefeld/D) in einer Quarzküvette vermessen. Hierbei wurde die Küvette mit mindestens 100 µl befüllt und vermessen. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass die gemessene Extinktion in einem linearen Bereich zwischen 0,1 und 1 lag. Der molare Extinktionskoeffizient wurde mit Hilfe des Protein Calculator (Version 3.3) des Scribbs Forschungsinstituts (La Jolla/USA) bestimmt und die Konzentration durch die Verwendung obiger Formel rechnerisch ermittelt.

3.2.3.2 Quantifizierung nach Bradford

Neben der Quantifizierung durch UV-Absorption wurden ebenfalls Protein-Bestimmungen nach der Methode von Bradford durchgeführt. Hierbei wird sich die Absorption des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau bei 595 nm zunutze gemacht, die nach Anlagerung an das Protein bestimmt werden kann. Der Assay wurde in 96-Well Platten durchgeführt. Dabei wurden pro Well 100 µl des 20 prozentigen Bradford-Reagenzes der Firma Biorad (München/D) vorgelegt. Als Referenz diente eine Verdünnungsreihe an IgG, wobei dem vorgelegten Bradford-Reagenz jeweils 34,5 µl einer 1,4 mg/ml-, 0,7 mg/ml-, 0,35 mg/ml-, 0,175 mg/ml- oder 0 mg/ml-haltigen IgG-Lösung zugegeben wurde. Die zu vermessende Probe wurde 1 zu 10 sowie 1 zu 20 verdünnt und hiervon wurden ebenfalls 34,5 µl zu den vorgelegten 100 µl gegeben. Im Anschluss daran wurde die Platte kurz geschüttelt und in einem Mikropplatten-Reader [GENios Pro der Firma Tecan (Männedorf/Schweiz)] vermessen. Die Absorption der IgG-Lösungen bei 595 nm wurde danach gegen die bekannte Konzentration aufgetragen, eine Regression errechnet und die hierdurch erhaltene Geradengleichung für die Bestimmung der unbekanntenen Proteinproben verwendet.

3.2.3.3 Fluoreszenz-Polarisations-Assay

Im Gegensatz zur Bestimmung der Proteinquantitäten per UV-Absorption und der Bradford-Methode, mit deren Hilfe sich ausschließlich die Gesamtproteinkonzentration bestimmen lassen, kann durch Verwendung des Fluoreszenz-Polarisations-Assays der Proteinanteil quantifiziert werden, der korrekt gefaltet, also aktiv, ist. Zu diesem Zweck wird ein Farbstoff hinzugezogen, der aufgrund einer chemischen Modifikation in der Lage ist, an ein gegebenes Protein in einer aktiven Tasche zu binden. Dieser Vorgang wird im Gegensatz zum Bradford-Reagenz nur dann ausgelöst, wenn das Protein korrekt gefaltet ist. Um FKBP-Mengen exakt bestimmen zu können, nutzen wir einen Farbstoff, der als Derivat von Rapamycin sehr gut an die FK1-Domäne von FKBP binden kann (CK97).

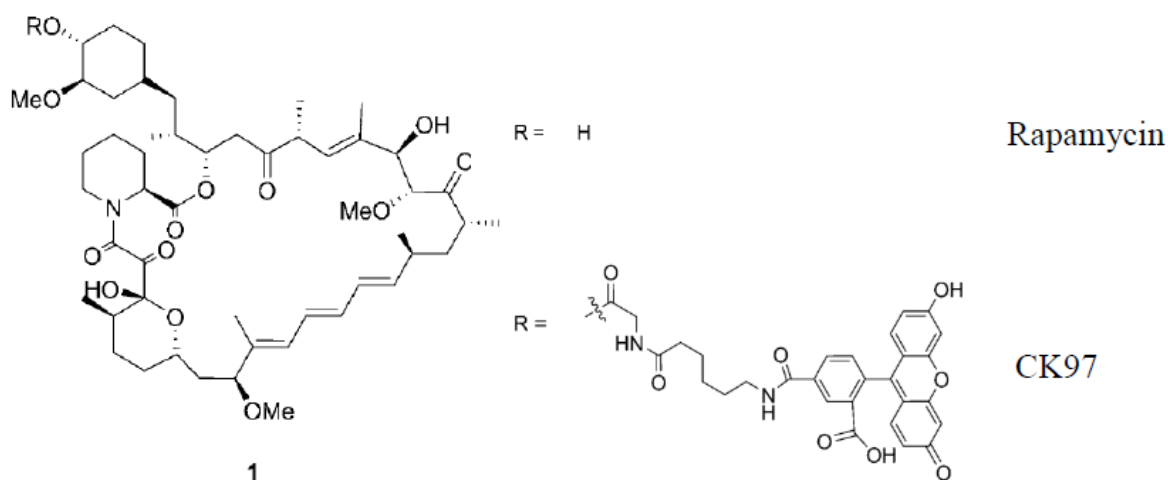


Abbildung 7: Struktur von Rapamycin und CK97

In einer *low binding* 96-Well-Platte der Firma Corning (Corning/USA) wurde eine Verdünnungsreihe des Proteins hergestellt. Hierbei wurde versucht, mit einer etwa 20 μM Lösung zu beginnen. Diese Konzentration wurde mit Hilfe einer der zuvor beschriebenen Quantifizierungsmethoden bestimmt. Danach wurden 14 Wells mit jeweils 50 μl des Assaypuffers befüllt. Nun wurde durch einen Transfer von 50 μl der höchsten Konzentration in das nächste Well und mit Hilfe der guten Durchmischung durch Auf- und Abpipettieren eine 1-zu-1-Konzentrationsreihe hergestellt. Vor Erreichen des letzten, 16. Wells wurden 50 μl der letzten Konzentration abgenommen und verworfen, sodass nun mit einer Ausnahme alle Wells mit nur 50 μl Proteinlösung befüllt waren. Das abschließende Well allerdings war ausschließlich mit Puffer versetzt. Im Anschluss wurden jeweils 25 μl einer jeden Konzentration in eine 384-Well-*low-binding*-Platte der Firma Corning (Corning/USA) transferiert und mit 25 μl einer 50 nM CK97-Lösung im Assaypuffer versetzt. Diese Lösung wurde für 30 Minuten inkubiert und vermessen. Das hierfür verwendete Programm setzte sich wie folgt zusammen:

Mode: Fluoreszenz Polarisation

Wellenlängen: Exzitation: 485 nm, Emission: 535 nm

Number of reads: 10; Integrationszeit: 100 μs

Temperatur: 25°C

Die Umpolarisation (P) des linear polarisierten Lichts wurde durch Messungen der Intensitäten (I) des parallel (par) und senkrecht (per) emittierten Lichts bestimmt. Hierbei gilt:

$$P = \left(\frac{I_{\text{parallel}} - I_{\text{senkrecht}}}{I_{\text{parallel}} + I_{\text{senkrecht}}} \right) \times 100$$

Anschließend konnten die erhaltenen mP-Werte gegen die Proteinverdünnung aufgetragen werden und durch Verwendung eines *Four-Parameter-logistic-curve-Fits* mit Hilfe der Software SigmaPlot [Systat Software (Erkrath/D)] analysiert werden. Auf diese Weise wurde der jeweilige EC₅₀-Wert (siehe untere Formel) bestimmt, der wiederum den Verdünnungsfaktor des Proteins darstellt. Dieser Faktor spiegelt die Konzentration des Proteins wider, bei der die Hälfte des eingesetzten Tracers an das zu vermessende Protein gebunden ist. Anschließend ist es möglich, auf die ursprünglich eingesetzte Proteinkonzentration rückzuschließen beziehungsweise diese zu berechnen, indem die Hälfte der eingesetzten CK97-Konzentration mit dem erhaltenen EC₅₀-Wert multipliziert wird.

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + x^{\text{Hillslope}} / EC_{50}}$$

3.3 Zellbiologische Methoden und Assays

3.3.1 Neuro-2a und HEK Zellen

3.3.1.1 Kultivierung

Sämtliche Zelllinien wurden in luftbefeuchteten Inkubatoren bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (Standardbedingungen). Der Zellwuchs wurde standardmäßig in dafür vorgesehenen Zellkulturschalen oder Multi-Well-Platten ermöglicht. Im Falle der Neuro-2a-Zellen wurden sämtliche Zellkulturplatten zuvor mit Polylysin beschichtet. Hierfür wurden die Platten vor der Zellpassage mit einer 0,02 mg/ml-haltigen Polylysin/PBS-Lösung der Firma Merck-Millipore (Billerica/USA) überschichtet und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde diese Lösung abgenommen und einmal mit einer PBS-Lösung gewaschen. Danach konnten die Platten für die Zellkultivierung verwendet oder bei 4 °C aufbewahrt werden.

Bei allen eingesetzten Zellen handelte es sich um adhärenente Zellen. HEK- sowie Neuro-2a-Zellen wurden generell in DMEM kultiviert, das sowohl Phenolrot als auch fetales Kälberserum (10 % v/v) sowie Penicillin/Streptomycin (je 1 % v/v) enthielt. Für die Durchführung von Neuriten-Wachstums-Assays wurde zusätzlich DMEM verwendet, das keine der beiden Zusätze mehr enthielt (siehe hierzu auch Kapitel 3.3.1.2). Die Zellen wurden jeweils so lange kultiviert, bis ihre Dichte eine Höhe erreichte, die eine weitere Proliferation unmöglich machte (90 % konfluent). In diesem Fall wurde das Zellmedium abgenommen, die Platte mit 10 ml vorgewärmten PBS vorsichtig gewaschen, die PBS-Lösung abgenommen und mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %) versetzt. Darauf wurden die Zellen für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert, was eine Dissoziation der Zellen von der Platte wie auch der Zellen voneinander ermöglichte. Im Anschluss wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren weitergehend voneinander gelöst und in 5 ml DMEM gegeben, um die Typsinierung zu beenden. Als nächstes wurden sie bei 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert, sodass sämtliche vitalen Zellen pelletierten. Hiernach wurde der Überstand abgenommen und ein Resuspendierungsschritt durchgeführt, bei dem abermals 5 ml DMEM zum Einsatz gelangten. Von dieser Zellsuspension wurde nun ein Aliquot auf eine frische Zellkulturplatte gegeben, welche zuvor mit einer ausreichenden Menge DMEM inklusive der oben genannten Zusätze befüllt wurde. Die Zellen wurden in der Regel zweimal pro Woche gesplittet (montags und freitags) und dabei derart verdünnt ausgesät, meist 1 zu 7 und 1 zu 10, dass sie innerhalb von vier Tagen wieder konfluent waren.

3.3.1.2 Neuriten-Wachstums-Assay von Neuro-2a-Zellen

Für die Umsetzung des Neuriten-Wachstums-Assays sind generell 24-Well Platten verwendet worden. In ihren Vertiefungen befanden sich Deckgläser, die zuvor 24 Stunden mit Polylysin beschichtet wurden. Vor der Beschichtung dieser Deckgläser mussten diese zunächst von ihrer eigentlichen Beschichtung befreit werden. Hierfür wurden sie zunächst mit Chloroform überschichtet und für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Danach wurde das Chloroform abgenommen, verworfen und die Deckgläser wurden wiederholt mit reinem Ethanol überschichtet und weitere 5 Minuten geschwenkt. Diese Ethanol-Reinigungsschritte wurden insgesamt dreimal wiederholt. Nachdem die letzte Ethanol-Waschlösung abgenommen war, wurden die Deckgläser bei 70 °C über Nacht getrocknet, am darauffolgenden Tag in die 24-Well-Platten überführt und mit Polylysin beschichtet. Nach Ablauf weiterer 24 Stunden erfüllten die Platten die Voraussetzung für die Durchführung von Neuriten-Wachstums-Assays mit Neuro-2a-Zellen.

Zu genanntem Zweck wurden Neuro-2a-Zellen wie weiter oben beschrieben kultiviert. Am Tag der Assay-Durchführung wurden die Zellen von ihrer ursprünglichen Zellkulturplatte abgenommen und wie in Kapitel 3.3.1.1 dargelegt trypsiniert, zentrifugiert und resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und pro Well 35.000 Zellen in DMEM inklusive FCS (10 %) und P/S (1 %) ausgesät. Nachfolgend wurden sie unter Standardbedingungen über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium entfernt und pro Well 400 µl DMEM (inklusive Phenolrot) ohne weitere Zusätze zugegeben. Je nach Versuchsaufbau wurden nun unterschiedliche Plasmide transfiziert oder die Zellen mit verschiedenen Wirkstoffen behandelt. Beides fand stets zeitgleich im Moment des soeben beschriebenen Mediumwechsels statt. Wurden die Zellen mit zusätzlichen Verbindungen behandelt, wie beispielsweise mit Steroiden oder FKBP-Inhibitoren, so wurden sie in den 400 µl DMEM zugegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass das finale Volumen der Wells nicht 400 µl sondern 500 µl betrug. Das bedeutet, dass alle Verbindungen in 400 µl und 1,25-facher Konzentration eingesetzt wurden, um final die korrekte Konzentration aufzuweisen.

Generell wurden alle N2a-Zellen mit einem myristinylierten Venus-Konstrukt transfiziert, um sie während der Analyse der neugebildeten Neuriten am Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen zu können. Weiter wurde entweder ausschließlich pRK5-Kontrollvektoren transfiziert oder Proteine, welche in denselben Vektor zuvor einkloniert wurden (beispielsweise FKBP). Der komplette Transfektionsansatz setzte sich pro Well wie folgt zusammen:

3. Methoden

myr-Venus:	80 ng
pRK5 / pRK5-Protein“X“:	720 ng
Lipofectamin 2000:	1,5 µl
<hr/>	
Totalvolumen:	100 µl

Pro Transfektion wurden zunächst die benötigten Plasmide in 50 µl Opti-MEM gelöst. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 1,5 µl Lipofectamin 2000 ebenfalls in 50 µl Opti-MEM gegeben. Die Lösungen wurden 5 Minuten inkubiert, danach zusammengeführt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde das Transfektions-Gemisch von nunmehr 100 µl zu den bereits vorgelegten 400 µl DMEM der Zellen gegeben und die Platte wieder in den Inkubator rücküberführt, um dort unter Standardbedingungen für weitere 30 oder 48 Stunden (je nach Versuch) zu kultivieren. Da den Neuro-2a Zellen auf diese Weise FCS entzogen wurde, begannen sie nun sich zu differenzieren.

Nach Ablauf der 30 bzw. 48 Stunden wurde das Medium von den Zellen abgenommen und diese wurden einmal mit einer warmen PBS-Lösung gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 300 µl Fixierlösung versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde die PFA-Lösung abgenommen und die Zellen abermals dreimal mit einer PBS-Lösung für jeweils 5 Minuten gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Deckgläser, auf denen sich die bereits fixierten Zellen befanden, für die weitere Analyse auf Objektträger des Fluoreszenzmikroskops überführt. Auf die Objektträger wurde zuvor pro Deckglas 4 µl Vectashield (Mounting Medium) gegeben. Nun wurden unter Einsatz von Pinzetten die Deckgläser aus den 24-Well-Platten herausgenommen und umgedreht auf den Tropfen des Mounting-Mediums gelegt. In einem letzten Schritt wurden die Deckgläser mit handelsüblichem, klarem Nagellack an den Kanten des Deckglases bestrichen und verschlossen. Im Anschluss wurden alle Objektträger bei 4 °C aufbewahrt und konnten unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops Axioplan 2 und der Software AxioVision 4.7.1 der Firma Carl Zeiss (Oberkochen/D) mikroskopiert und analysiert werden.

Für die Analyse der Neuritenlängen wurden 40-fach vergrößerte Einzelbildaufnahmen von mindestens 25 Zellen pro gegebener Bedingung angefertigt. Die Aufnahmen und die Auswertung der Bilder wurden mit einem verblindeten Experimentaldesign durchgeführt, sodass infolgedessen die Versuchsbedingungen den Aufnahmen nicht zugeordnet werden konnten. Schließlich wurden die aufgenommenen Bilder zur Analyse der Neuritenlängen an einen wissenschaftlichen Kollegen (Dr. Steffen Gaali) übergeben, der die durchschnittlichen Längen der Neuriten durch Verwendung der Software ImageJ der Firma NIH (Bethesda/USA) mit dem Plugin NeuronJ bestimmte.

Fixierlösung: PBS, PFA 4 %, Saccharose 5 %

3.3.2 Radioaktiv-Bindungsassay

3.3.2.1 Herstellung der Aktivkohle/Dextran

Suspension

Zur Herstellung von steroidfreiem FCS wurden 500 ml Tris/HCl 10 mM pH 7,8 mit 50 g Aktivkohle versetzt und 10 Minuten gerührt. Im Anschluss ruhte die Suspension, sodass sich eine Sedimentierung der Kohle vollziehen konnte. Alsdann wurde der Überstand abdekantiert und die feuchte Aktivkohle nochmals mit 500 ml Tris/HCl 10 mM pH 7,8 überschichtet. Nach einem weiteren Rührvorgang wurde die Lösung infolge einer Ruhephase erneut abdekantiert, die Kohle wurde mit 400 ml Tris/HCl 10 mM pH 8,0 überschichtet und zusätzlich mit 5 g Dextran T70 versetzt. Nach anschließendem Autoklavieren war die Lösung in einen optimal gebrauchsfertigen Zustand überführt.

3.3.2.2 Herstellung von steroidfreien FCS

Für die korrekte Durchführung des Radioaktiv-Bindungsassays war es unabdingbar, die GR-überexprimierenden HEK-Zellen (AXGR16) vor Herstellung der Zelllysate in steroidfreiem Medium zu kultivieren. Steroide sind in handelsüblichen FCS enthalten und mussten daher in einem vorgelagerten Reinigungsschritt aus diesem entfernt werden. Hierfür wurden 500 ml FCS mit 25 g des Anionentauschers AG1-X8 der Firma Bio-Rad (München/D) versetzt und über Nacht bei 4 °C gerührt. Am nächsten Tag wurde dieser Vorgang eingestellt, um die Sedimentierung des Ionentauschers zu ermöglichen. Nun wurde die Lösung abdekantiert und der Überstand wurde mit 10 ml der in Kapitel 3.3.2.1 beschriebenen Aktivkohlen-Suspension versetzt und nochmals über Nacht bei 4 °C gerührt. Am Folgetag ruhte die Lösung, sodass ein Großteil der Aktivkohle sedimentieren konnte. Es folgte eine weitere Abdekantierung. Der Überstand wurde anschließend filtriert und durch Verwendung eines Sterilfilters mit der Porengröße 0,2 µm sterilisiert. Das von Steroiden befreite FCS konnte nun verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.3.2.3 Präparation von Zelllysaten

Zur Herstellung der Zelllysate wurden fortwährend stabil transfizierte, GR überexprimierende HEK-Zellen angewandt (AXGR16). Diese wurden zunächst, wie schon weiter oben beschrieben, kultiviert (siehe Kapitel 3.3.1.1), um sie anschließend auf insgesamt 50 Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 15 cm auszusäen. Als Voraussetzung dieses Arbeitsvorgangs galt jedoch, dass die

Platten am Tag der Präparation mindestens zu 90 % konfluent waren und die Zellen sich in steroidfreiem DMEM ohne Phenolrot befanden. Im ersten Behandlungsschritt wurde im Folgenden das Medium abgenommen und pro Platte wurden 5 ml PBS-Lösung zugegeben. Nun wurden entweder durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch die Verwendung eines Zellschabers die Zellen von der Platte gelöst und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Auf diese Weise konnte das gesamte Zellmaterial aller Schalen gesammelt werden. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert (1200 g bei Raumtemperatur für 10 Minuten), der Überstand wurde abgesaugt. Die Zellpellets wurden mit 10 ml PBS vereinigt, um ein weiteres Mal zentrifugiert zu werden (1200 g bei Raumtemperatur für 10 Minuten). Hiernach konnte das Zellpellet in 6 ml kalten TGW-Puffer aufgenommen und mit Hilfe eines Gewebehomogenisators auf Eis innerhalb von 20 Minuten aufgeschlossen werden. Die Suspension wurde danach mit Hilfe einer Ultrazentrifuge getrennt. Hierbei wurde bei 100.000 g und 4 °C für 2 Stunden zentrifugiert. Nun konnte der Überstand abgenommen, aliquotiert und bei – 80 °C aufbewahrt werden.

Steroid-freies Kultivierungsmedium: DMEM, FCS 10 % (steroid-frei), Pen/Strep 1 %

TGW Puffer: Tris/HCl 5 mM, EDTA 1 mM, Glycerol 5 %, pH7,4

3.3.2.4 Radioaktiv-Bindungsassay

Mit Hilfe eines Radioaktiv-Hormonbindungsassays konnte im Rahmen dieser Arbeit die Bindung von radioaktiv-markiertem Dexamethason (^3H -Dex) an den Glucocorticoid-Rezeptor sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt werden. Der Assay wurde zu diesem Zweck generell in 1,5 ml *low-binding* Reaktionsgefäßen der Firma Eppendorf (Hamburg/D) durchgeführt. Weiter wurden alle Werte im Triplikат generiert, um eine möglichst exakte Bestimmung des K_d -Werts von ^3H -Dex an den GR zu erhalten.

Zur Bestimmung der Bindung wurden zunächst ca. 10 μl des Lysats (100 μg Gesamtprotein) in den Reaktionsgefäßen vorgelegt. Nun wurden die Proben entweder mit *in-vitro* aufgereinigten FKBP (siehe Kapitel 3.2.1) oder ausschließlich mit dem Puffer selbiger versetzt. Alle weiteren Arbeitsschritte fanden aufgrund der Verwendung radioaktiven Materials in einem Isotopenlabor statt. Zu Beginn wurden für die Aufnahme kompletter Bindungskurven Verdünnungsreihen von ^3H -Dex hergestellt. Hierfür wurden 100 μl einer 375 nM Lösung in dreifachen Reaktionspuffer zubereitet. 50 μl dieser Lösung wurden nun in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 100 μl des dreifachen Reaktionspuffer vorgelegt wurden. Nach mehrmaligen Auf- und Abpipettieren wurden schließlich 50 μl der Lösung in ein drittes Gefäß überführt. Diese Verdünnungsschritte wurden insgesamt siebenmal wiederholt, sodass eine ^3H -Dex-Verdünnungsreihe zwischen 375 nM und 0,06 nM entstand. Daraufhin wurden die auf Eis gelagerten Lysate mit insgesamt 10 μl der ^3H -Dex-Verdünnungsreihe versetzt. Die Folge: Die höchste Konzentration des zugegebenen ^3H -Dex betrug nun 125 nM während die niedrigste nur noch bei 0,02 nM lag.

Um exakte Aussagen bezüglich der unspezifischen Bindung des radioaktiven Steroids an andere Komponenten des Lysats treffen zu können, wurde eine zusätzliche Reihe des Lysats mit allen ^3H -Dex-Konzentrationen versetzt. Zudem wurde ein 1000-facher Überschuss nicht radioaktiv markierten Dexamethasons zugegeben. Um die im Fortgang gemessene Radioaktivität mit der exakten Konzentration des Steroids korrelieren zu können, wurde außerdem eine Standard-Reihe produziert, die ausschließlich Puffer enthielt.

Im nun folgenden Arbeitsschritt wurden alle Probe mit einem Gesamtvolumen von 30 μl für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben in ein Wasserbad überführt und weitere 30 Minuten inkubiert. Danach wurden in jedes Reaktionsgefäß 20 μl der in Kapitel 3.3.2.1 beschriebenen Aktivkohle/Dextran-Suspension gegeben, die Gefäße wurden 10 Minuten auf Eis inkubiert und gevortext. Auf diese Weise konnte das ungebundene radioaktive Dexamethason entfernt werden. Im Falle der Standard-Reihe wurde anstelle der Aktivkohle/Dextran-Suspension lediglich 20 μl Puffer zugegeben, da hier kein radioaktiv markiertes Dexamethason entfernt werden

durfte. In einem anschließenden Zentrifugationsschritt wurde die Aktivkohle sedimentiert (1800 g bei RT für 1 Minute). Nun wurden 25 µl des Überstandes abgenommen, in ein Scintillationsröhrchen gegeben und mit 3 ml Scintillationscocktail Lumasafe der Firma Perkin Elmer (Waltham/USA) überschichtet. Das Gefäß wurde verschlossen, gevortext und konnte nun in einem LS6500 Multi-purpose Scintillation Counter der Firma Beckman Coulter (Krefeld/D) vermessen werden.

Nach Abzug der Werte der unspezifischen Bindungen konnte die gemessene Radioaktivität durch Verwendung der Standard-Reihe in die entsprechende Konzentration des spezifisch an den GR gebundenen Dexamethasons umgerechnet und anschließend in einem Diagramm gegen die Konzentration des vorhandenen freien radioaktiven Dexamethasons aufgetragen werden (siehe auch Abbildung 27 und Abbildung 30). Durch Hinzuziehung der unten aufgeführten Gleichung war es nun möglich, sowohl den B_{max} -Wert, welcher die Gesamtzahl der im Lysat vorhandenen Rezeptoren repräsentiert, wie auch den K_d -Wert zu berechnen. Der K_d -Wert gibt in diesem Zusammenhang die Konzentration des Liganden an, bei der die Hälfte aller Rezeptormoleküle besetzt sind. Sämtliche Auswertungen wurden mit Hilfe der Software SigmaPlot der Firma Systat Software (Erkrath/D) durchgeführt.

$$specific = \frac{B_{max} \times x}{k_d + x}$$

Abbildung 8: Formel für die Berechnung des B_{max} - und K_d -Wertes von Dexamethason an den GR

Finale Reaktionsbedingungen:

Tris/HCl 20 mM, KCl 20 mM, MgAc 2 mM, ATP 2 mM, DTT 1 mM, pH 7,4

3.3.3 Primäre Neuronen

3.3.3.1 *Präparation und Kultivierung*

Für die Präparation primärer hippocampaler Zellen wurden Hippocampi aus Wildtyp C57/Bl6-Mäusen am 18. Tag der embryonalen Entwicklung (E18) entnommen. Diese wurden nach der Präparation in einem Aufschluss-Medium auf Eis gesammelt. Nun wurden die Zellen durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren bei Raumtemperatur mit einer sterilen Plastik-Pasteurpipette voneinander getrennt. Hiernach wurden die Zellen erneut 40 mal mit einer Glas-Pasteurpipette und 20 mal mit einer Pasteurpipette, deren Hals durch die Verwendung eines Bunsenbrenners geschmälert worden war, auf- und abpipettiert. Nun lagen die Zellen dissoziiert vor und konnten durch einen Zentrifugationsschritt sedimentiert werden (200 g bei Raumtemperatur für 5 Minuten). Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in 5 ml Plattierungs-Medium resuspendiert. Nun wurden sie unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und derart in Plattierungs-Medium verdünnt, dass eine finale Zellkonzentration von 100.000 Zellen pro ml Medium vorlag. Hiervon wurde in einer 12-Well-Platte, die mit Polylysin-beschichteten Deckgläsern versehen war, 1 ml, also 100.000 Zellen, pro Well ausgesät. Nach 4 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch Wachstums-Medium ersetzt sowie im Falle eines Neuriten-Wachstums-Assays viral transfiziert oder mit unterschiedlichen Behandlungsmethoden weiter bearbeitet.

Aufschluss-Medium: HBSS (inklusive Mg^{2+} und Ca^{2+} und Phenolrot), D-AP5 50 μ M

Plattierungs-Medium: DMEM (inklusive Phenolrot), FCS 10 %, Penicillin/Streptomycin 1 %

Wachstums-Medium: Neurobasal, B27 2 %, Glutamax 1 %, Penicillin/Streptomycin 1 %

3.3.3.2 Neuriten-Wachstums-Assay

Für die Durchführung eines Neuriten-Wachstums-Assays wurden die primären Neurone unter Hinzuziehung von speziell hierfür hergestellten Adeno-Assoziierten Viren (AAV) mit den entsprechenden Konstrukten eGFP, FKBP51 oder FKBP51F67V transfiziert. Hierbei wurde generell in 12-Well-Platten gearbeitet. Am Folgetag der Zellpräparation (DIV 1) wurde das Wachstumsmedium mit 1 µl Virus versetzt und die Zellen wurden auf diese Weise transfiziert. Nun wurden sie für weitere 48 Stunden inkubiert. An DIV 3 wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Abnahme der Waschlösung folgte bei Raumtemperatur eine 20-minütige Zell-Behandlung mit Fixierlösung. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten mit je 1 ml Permeations-Puffer behandelt. Nun wurden die Zellen mit 1 ml Blocking-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde entweder ein anti-GFP-Antikörper der Firma Abcam (Cambridge/UK) oder ein anti-HA-Antikörper der Firma Covance (Princeton/USA) nach Herstellerangaben in entsprechendem Puffer gelöst und auf die Zellen gegeben. Es folgte über Nacht eine Inkubation der Zellen bei 4 °C auf einem Kippschüttler. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und dreimal mit Waschpuffer für 10 Minuten gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit einem Fluorophor-markierten Sekundär-Antikörper der Firma Life Technologies (Carlsbad/USA), welcher ebenfalls nach Herstellerangaben in entsprechendem Puffer verdünnt wurde. Die Zellen wurden mit dieser Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Voraussetzung war dabei, dass in dieser Zeit kein Licht an die Multiwellplatte gelangen konnte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung abgenommen, die Zellen wurden dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen und in einem letzten Reinigungsschritt nochmals mit PBS behandelt. Nachfolgend wurden die Deckgläser, auf denen sich die bereits fixierten Zellen befanden, für die weitere Analyse auf Objektträger am Fluoreszenzmikroskop überführt. Auf genannte Träger wurden bereits vorab pro Deckglas 4 µl Vectashield (Mounting Medium) gegeben. Nun wurde unter dem Einsatz von Pinzetten die Deckgläser aus den 24-Well-Platten herausgenommen und umgekehrt auf den Tropfen des Mounting-Mediums gestellt. In einem letzten Schritt wurden die Deckgläser mit handelsüblichem, klarem Nagellack an den Kanten des Deckglases bestrichen und verschlossen. Im Anschluss konnten alle Objektträger bei 4 °C aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops AxioPlan 2 und der Software AxioVision 4.7.1 der Firma Carl Zeiss (Oberkochen/D) mikroskopiert und analysiert werden.

Für die Analyse der Neuritenlängen wurden in 40-fach vergrößerten Einzelbildaufnahmen mindestens 25 Zellen pro gegebener Bedingung aufgenommen. Auch diese Mal wurden die Bilder verblendet angefertigt, um eine mögliche Zuordnung der Versuchsbedingungen zu den Aufnahmen erst nach der Auswertung zu erlauben. Die aufgenommenen Bilder wurden zur Analyse der

3. Methoden

Neuritenlängen an einen wissenschaftlichen Kollegen (Dr. Steffen Gaali) übergeben, der im Anschluss die durchschnittlichen Längen durch Verwendung der Software ImageJ der Firma NIH (Bethesda/USA) mit dem Plugin NeuronJ bestimmte.

Permeations-Puffer:	PBS, Triton X-100 0,1 %
Blocking-Puffer:	PBS, Triton X-100 0,1 %, BSA 5 %
Wasch-Puffer:	PBS, Triton X-100 0,01 %
Lösung für Antikörper:	PBS, Triton X-100 0,01 %, BSA 5 %
Fixierlösung:	PBS, PFA 4 %, Saccharose 5 %

3.3.4 Immunoblotting

Die Prozedur des Immunoblottings wurde nach Empfehlungen der Firma Invitrogen (Karlsruhe/D) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die Trennung eines Proteingemischs durch eine SDS-PAA-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2). Im Anschluss wurden die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Hierzu wurde ein Xcell-II-Blot-Modul mit Blotting-Kammer der Firma Invitrogen (Karlsruhe/D) verwendet. Die Kammer wurde zu diesem Zweck mit Blotting-Puffer gefüllt, das Gel samt Nitrozellulose-Membran zwischen die dafür vorgesehenen Schwämme in die Kammer gegeben und für eine Stunde ein konstanter Strom von 400 mA angelegt.

Nach erfolgreich abgeschlossenem Transfer der Proteine auf die Membran bot sich fakultativ die Möglichkeit, diese mit einer Ponceau-S-Lösung zu färben und auf diese Weise die übertragenen Proteine sichtbar zu machen. Hiernach wurde die Membran durch einen Reinigungsschritt in Wasser entfärbt. Im Anschluss wurde die Membran in einer 5 % Milchpulver-haltigen TBS-T-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der verwendete primäre Antikörper nach Herstellerangaben ebenfalls in Milch-TBS-T verdünnt, über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben und unter Verwendung eines Kippschüttlers inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgenommen, dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend mit einer sekundären Antikörper-Lösung, welche ebenfalls Herstellerangaben in Milch-TBS-T nach Herstellerangaben verdünnt wurde, für 2 weitere Stunden inkubiert. Der verwendete sekundäre Antikörper wies stets eine Kopplung an *horseradish* Peroxidase auf.

Im nächsten Schritt wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen, bevor sie aus der Waschlösung genommen und durch Zugabe von 2 ml ECL, welches durch eine Mischung von jeweils 1 ml ECL 1 und 1 ml ECL 2 kurz vor der Entwicklung des Blots frisch angesetzt wurde, eine Lumineszenzreaktion gestartet wurde. Die Membran wurde hierbei 5 Minuten inkubiert, das ECL wurde abgenommen und mit Hilfe einer ChemiDoc MP-Entwicklermaschine der Firma Bio Rad (München/D) entwickelt. Die Belichtungszeiten wurden hierbei immer manuell an die jeweilige Intensität des emittierten Licht-Signals angepasst. Die Bilder wurden mit der Software ImageLab 4.0 der Firma Bio Rad (München/D) aufgenommen und analysiert.

3. Methoden

Blotting Puffer: Tris 20 mM, Glycin 150 mM, SDS 0.02%, Methanol 20%

Ponceau S: Ponceau S 0.5%, Essigsäure 3%

TBS-T: TBS, Tween 20 0.05%

Milchpulver-Lösung 5 %: TBS-T, Milchpulver 5%

Milchpulver-Lösung 10 %: TBS-T, Milchpulver 10 %

ECL1: Tris/HCl 100 mM pH 8.5, Luminol 440 mg/l, p-Coumarinsäure 150 mg/l

ECL2: Tris/HCl 100 mM pH 8.5, H₂O₂ 30%

4 Ergebnisse

4.1 Der Einfluss von FKBP5s auf das Neuritenwachstum von Neuroblastom-Zellen

Neurotrophe sowie neuroregenerative Effekte von FKBP-Liganden wie FK506 sind wiederholt in Zell- wie auch Tiersystemen beschrieben worden. Bislang konnten jedoch keine genauen Aussagen darüber getroffen werden, ob ein und wenn ja welches Mitglied der FKBP-Familie für derartige Effekte verantwortlich ist. Eines der bislang schwerwiegendsten Probleme in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass nahezu alle bislang beschriebenen FKBP-Liganden keine Selektivität gegenüber einzelner FKBP5s aufweisen. So werden etwa ihre berühmtesten Vertreter wie FK506 und Rapamycin, aber auch nicht-immunsuppressive Analoga wie Antascomycin oder FK1706 von allen FKBP5s fast gleich gut gebunden [155].

Es ist bekannt, dass verschiedene FKBP5s in unterschiedlicher Weise auf Steroidhormon-Rezeptoren (SHR) wirken. So zeigten unter anderem Riggs et al. [43], dass FKBP52 in der Lage ist, die hormonabhängige Genaktivierung durch den Glucocorticoidrezeptor signifikant zu steigern. FKBP51 hingegen vermag dessen Aktivität zu inhibieren. Interessanterweise demonstrierten Quinta et al. ebenfalls gegensätzliche Effekte von FKBP51 und FKBP52 im Bezug auf neuronale Differenzierung [158]. FKBP51 inhibiert den Neuritenwuchs von N2a-Zellen, während FKBP52 diesen verstärkt. Um zu überprüfen, ob sich zum einen das Neuritenwachstumsverhalten auf diese Proteinfamilie reduzieren lässt und ob sich solche Effekte gegebenenfalls pharmakologisch wieder umkehren lassen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein den Ausführungen in Kapitel 3.3.1.2 entsprechender Neuritenwachstums-Assay etabliert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Überexpression von FKBP51 zur Bildung verkürzter Neuriten führt (im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen), während das Transfizieren von FKBP52 die Bildung längerer Neuriten begünstigt (Abbildung 9).

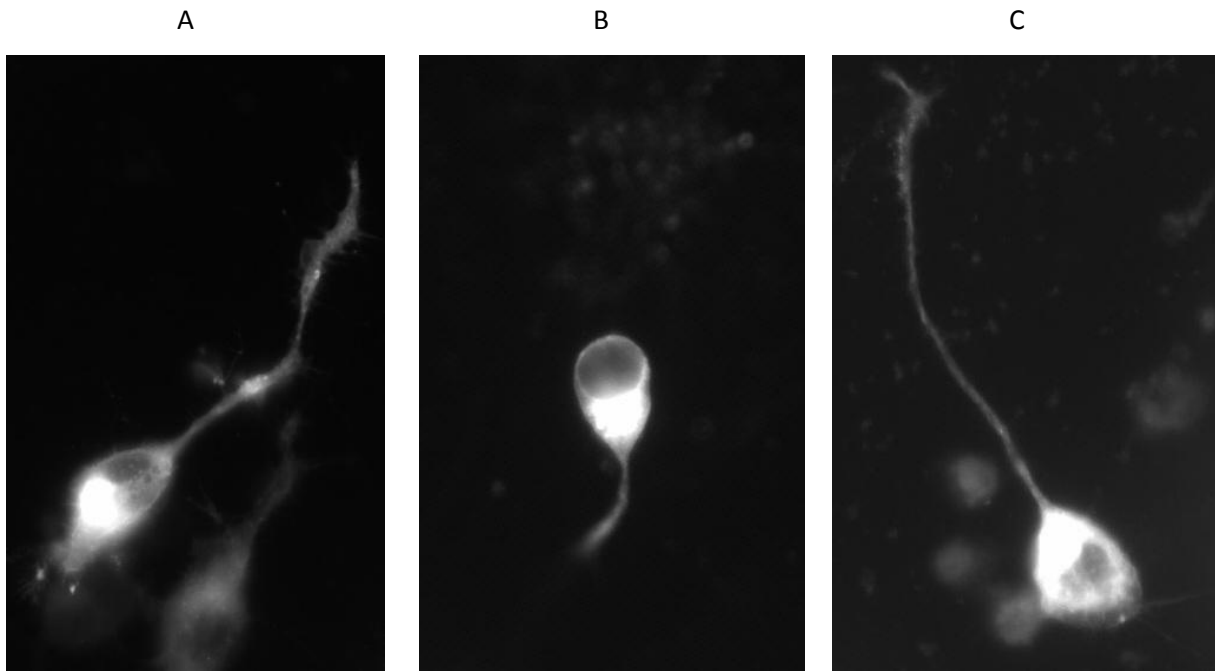


Abbildung 9: Das Neuritenwachstum von N2a-Zellen wird durch FKBP51 wie auch FKBP52 moduliert. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor(A), pRK5-FKBP51 (B) oder pRK5-FKBP52 (C) transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium getauscht, was eine Differenzierung der N2a-Zellen innerhalb 48h zur Folge hatte. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Da in unterschiedlichen Zusammenhängen bereits gezeigt werden konnte, dass beide Proteine häufig antagonistische Effekte auf ein biologisches System bewirken, drängte sich die Frage auf, ob FKBP51 und FKBP52 Einfluss auf die Effekte des jeweilig anderen Proteins nehmen können. Um dies zu überprüfen, führten wir einen Neuritenwachstums-Assay durch, in dem beide Proteine gleichzeitig exprimiert wurden. Zum einen wurden Zellen mit der gleichen Menge an FKBP51 und FKBP52 transfiziert, zum anderen jeweils eines der beiden Proteine mit einem zehnfachen Überschuss. Die gemeinsame Expression von FKBP51 und FKBP52 in gleichen Mengen führte zu einem Neuritenwuchs, welcher sich nicht von der Kontrolle unterschied. Es lässt sich somit festhalten, dass sich die Effekte beider Proteine, positive wie negative, in diesem Fall gegenseitig ausglich. Wurde jedoch eines der beiden Proteine im Überschuss in den N2a-Zellen exprimiert, so führte dies zu Effekten, die der alleinigen Expression von FKBP51 beziehungsweise FKBP52 ähnelten (Abbildung 10).

4. Ergebnisse

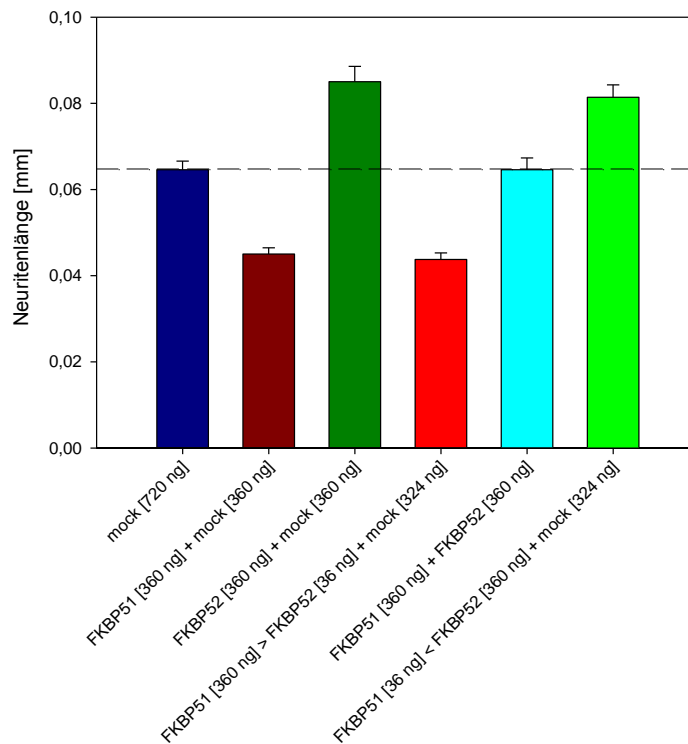


Abbildung 10: Neuritenwachstumsverhalten von FKBP51 und FKBP52 in überexprimierenden N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor, pRK5-FKBP51 oder pRK5-FKBP52 transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium getauscht und damit eine Differenzierung der N2a-Zellen für 48h ausgelöst. Die Zellen wurden entweder nur mit einem der beiden Proteine alleine oder gemeinsam in unterschiedlichen Mengen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

Durch die Co-Expression von FKBP51 und FKBP52 konnte nachgewiesen werden, dass die Effekte beider Proteine jeweils durch den anderen Gegenspieler ausgeglichen wurden. Es wurde ferner deutlich, dass die transfizierten Mengen an Plasmid ausschlaggebend für den jeweiligen Phänotyp sind. In einem weiteren Schritt interessierte daher, ob die Absolutlängen der jeweiligen Neuriten direkt proportional zu der Menge des transfizierten Plasmids waren. Dadurch die Expression von FKBP51 bereits das untere Limit der Detektionsmöglichkeiten erreicht und somit eine sukzessive Erhöhung der Plasmidmenge nicht mehr gemessen werden konnte, wurde die Hypothese mit Hilfe von FKBP52 getestet. Mit Hilfe eines Neuritenwachstumsassays, in dem die Plasmidmengen an FKBP52 sukzessive erhöht wurden (0 ng – 1600 ng pro Well), wurden erneut repräsentative Neuriten der jeweiligen Bedingung vermessen, ausgewertet und gegen die jeweilige DNA-Menge aufgetragen. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind Abbildung 11 zu entnehmen. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die gebildeten Neuriten proportional zu der transfizierten DNA entwickeln. Dabei ist auffällig, dass sich die Absolutlängen ab einer Plasmidmenge ab 900 ng auf einem stabilen Niveau um die 11 mm einpendeln, an diesem Punkt also das Plateau erreicht wird.

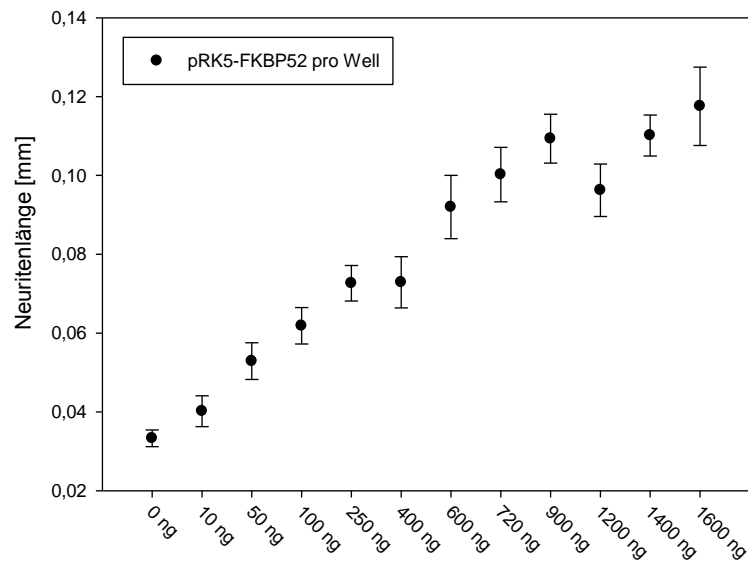


Abbildung 11: Neuritenwachstumsverhalten von FKBP52 überexprimierenden N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-FKBP52 in unterschiedlichen Quantitäten bezogen auf FKBP52 transfiziert (keine Unterschiede in den Absolutmengen transfizierter Plasmid-DNA). Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 48h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

Nachdem nun gezeigt war, dass FKBP52 und FKBP51 in der Lage sind, den Neuritenwuchs der N2a-Zellen antagonistisch zu modulieren und die jeweiligen Effekte proportional mit den transfizierten Mengen korrelierten, stellte sich die Frage, ob FKBP51-Varianten aus unterschiedlichen Organismen ähnliche Funktionen wie die humane Version übernehmen. Zur Überprüfung wurden entsprechende Proteine der Spezies *mus musculus* (Hausmaus) sowie *sameri boliviensis* (Totenkopffäffchen) getestet. Denny et al. [159] konnten bereits nachweisen, dass die FKBP51-Variante des Totenkopffäffchens im Vergleich zum humanen einen sechs-mal stärkeren Einfluss auf die Inhibition der Ligandenbindungsaffinität des Glucocorticoidrezeptors zu Steroiden hat. Dies führt unter anderem zu dem Phänomen der Glucocorticoid-Resistenz des Totenkopffäffchens. Hierbei handelt es sich um deutlich erhöhte ungebundene Cortisolspiegel der Breitnasenaffen der neuen Welt gegenüber der Schmalnasenaffen und Halbaffen der alten Welt [160]. Über den Einfluss der FKBP51-Variante aus *mus musculus* ist noch wenig bekannt, jedoch stellten wir in Fluoreszenz-Polarisations-Assays bereits fest, dass dieses Homolog von FKBP51 Liganden deutlich stärker zu binden vermag als humanes FKBP51. Radioaktiv-Bindungsstudien deuten an, dass sie gleichzeitig die Bindungsaffinität des GRs deutlich schwächer beeinflussen können. Wir untersuchten und verglichen daher die von den unterschiedlichen FKBP51-Varianten ausgelösten Effekte im Neuriten-Assay. Dabei

zeigte sich, dass humanes FKBP51 den Neuritenwuchs wie erwartet reduzierte (um 59 Prozent verglichen mit der Leerkontrollen-Transfektion). FKBP51 aus *mus musculus* zeigte in diesem Assay einen schwächeren Effekt. Die Absolutlängen wurden lediglich auf 84,5 Prozent reduziert. FKBP51 aus *sameri boliviensis* hingegen bewirkte einen stärkeren Effekt als die humane Variante. Der Auswuchs der Neuriten reduzierte sich signifikant auf 48,5 Prozent (Abbildung 12). Dies verdeutlicht, dass die inhibitorische Wirkung von FKBP51 Spezies-übergreifend konserviert ist und zudem gut mit der inhibitorischen Wirkung auf den Glucocorticoidrezeptor im Radioaktiv-Bindungsassay korreliert. Das Homolog aus *mus musculus* wirkt schwächer als die humane Variante, während FKBP51 aus *sameri boliviensis* einen stärkeren inhibitorischen Effekt auslöst.

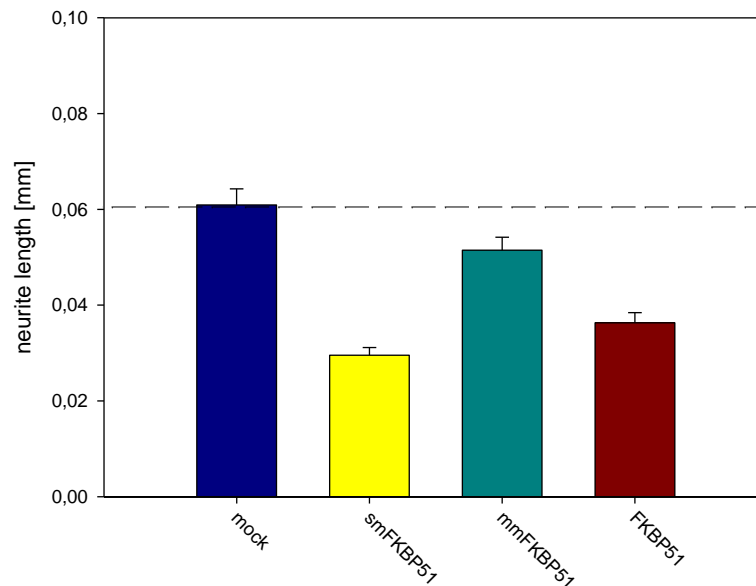


Abbildung 12: Einfluss verschiedener FKBP51-Varianten auf das Neuritenwachstumsverhalten von N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor, pRK5-FKBP51, pRK5-mmFKBP51 oder pRK5-smFKBP51 transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium getauscht und damit eine Differenzierung der N2a-Zellen für 48h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

4.2 Bestimmung relevanter Domänen von FKBP51 für die Modulation des Neuritenwachstums

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass sowohl FKBP51 als auch FKBP52 Einfluss auf die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen nehmen, stellte sich die Frage, welche ihrer Domänen dabei von Bedeutung sind. Beide FKBP5s besitzen eine N-terminale FK1-Domäne mit PPIase-Aktivität sowie ein C-terminales TPR-Motiv. Beide Motive sind für die Regulation von Steroidhormonrezeptoren von absoluter Bedeutung. Die TPR-Domäne interagiert dabei mit dem C-terminalen MEEVD-Motiv von Hsp90, sodass beide Co-Chaperone an den Steroidrezeptorkomplex binden können [43, 161]. Weiter ist eine intakte FK1-Domäne für die Interaktion mit dem Rezeptor erforderlich, jedoch scheint hierbei die PPIase-Aktivität nicht obligat zu sein [159, 162]. Um zu überprüfen, ob besagte Domänen im Kontext der neuronalen Differenzierung eine zentrale Rolle einnehmen, wurde FKBP51 an relevanten Positionen mutiert und das Ergebnis im Neuritenwachstums-Assay untersucht. Um die Frage zu beantworten, welche Rolle der PPIase-Aktivität zukommt, überprüften wir die Effekte von FKBP51FD67DV, welches kaum noch PPIase-Aktivität besitzt (FKBP51_PPIasmut). Weiter untersuchten wir FKBP51K352A/R356A (FKBP51_TPRmut), eine TPR-Mutante, die nicht mehr an Hsp90 zu binden vermag [163]. Wie in Abbildung 13 verdeutlicht, hat die Deletion der PPIase-Aktivität keinen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung von FKBP51. Wird hingegen die TPR-Domäne von FKBP51 derart mutiert, dass es nicht mehr in der Lage ist, an Hsp90 zu binden, verliert FKBP51 die Fähigkeit, die Differenzierung der N2a-Zellen negativ zu beeinflussen. Sowohl die Tatsache, dass die Modulation nicht auf der PPIase-Aktivität beruht, wie auch der Befund, dass eine intakte TPR-Domäne Voraussetzung für solch eine Modulation ist, ist konsistent mit der Annahme, dass Steroidhormonrezeptoren Einfluss auf die Differenzierung von neuronalen Zellen nehmen könnten.

4. Ergebnisse

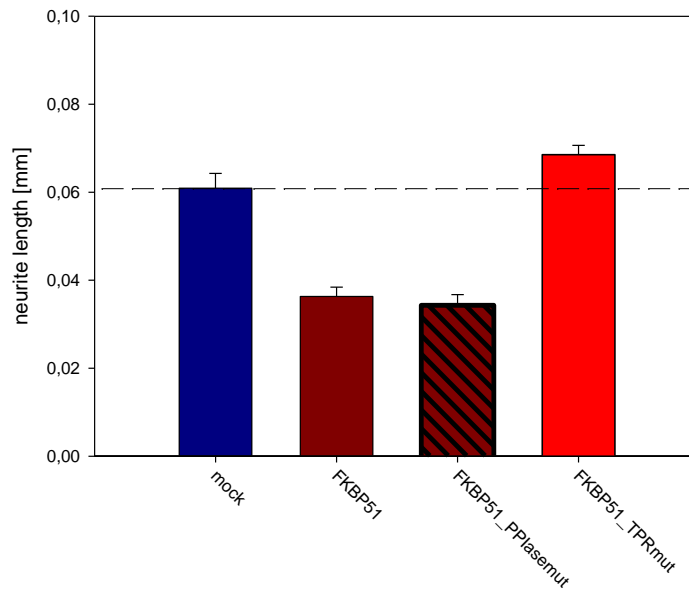


Abbildung 13: Effekte unterschiedlicher FKBP51-Mutationen auf das Neuritenwachstumsverhalten von N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor (Leerkontrolle), pRK5-FKBP51 oder pRK5-FKBP51FD67DV (FKBP51_PPlasemut) oder pRK5-FKBP51K352A/R356A (FKBP51_TPRmut) transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 48h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

4.3 Die Beeinflussung der N2a-Zelldifferenzierung durch eine selektive Inhibition von FKBP5

Liganden für die FK506-bindenden Proteine sind wiederholt im Kontext neurotropher wie auch neuroregenerativer Effekte beschrieben worden. Die bekanntesten Verbindungen sind hierbei FK506 und Rapamycin, deren primäre immunmodulatorischen Effekte auf Proteine wie Calcineurin und mTOR beruhen [164]. Um Effekte, die auf einer alleiniger Inhibition von FKBP5 beruhen, studieren zu können, eignen sich diese Verbindungen jedoch nur bedingt, da sie gleichzeitig immunsuppressiv wirken und daher unterschiedliche Signalwege auslösen können. Mittlerweile wurden jedoch Derivate synthetisiert, welche in der Lage sind, an FKBP5 zu binden ohne dabei immunmodulatorisch zu wirken (wie zum Beispiel FK1706) [165]. Zwar überwinden sie dadurch den Nachteil, einen zusätzlichen Einfluss auf das Immunsystem zu bewirken und somit unterschiedliche Signalwege auszulösen, jedoch sind auch diese Moleküle unspezifisch in der Inhibition von FKBP5. Somit sind auch sie für eine wissenschaftliche Untersuchung der Effekte einzelner FKBP5 ungeeignet.

Die von FKBP51 und FKBP52 ausgelösten Effekte sind in der Regel antagonistischer Natur (zum Beispiel in der Regulation von Steroidhormonrezeptoren [43, 161, 166]). Zudem erlangt FKBP51 eine immer größere Bedeutung im Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen, wie Assoziationen mit Einzelnukleotid-Polymorphismen des FKBP5-Gens und Charakterisierungen der Verhalten von *knockout* Mäusen verdeutlichen [89, 90, 167, 168]. Folglich war es an der Zeit, die von FKBP51 ausgelösten Effekte auf Neuritogenese mechanistisch näher zu beleuchten. Hierbei interessierten unter anderem die Fragen, inwieweit es möglich ist, FKBP51 pharmakologisch zu inhibieren und ob dies zu einer Antwort auf neuronaler Ebene führen kann. Da, wie oben beschrieben, sämtliche für die Familie der FKBP5 in Frage kommenden bekannten Liganden unspezifisch an verschiedene Subtypen binden (FK506 zum Beispiel bindet ebenso potent an FKBP51 wie an FKBP52), machten wir uns ein Werkzeug der chemischen Genomik zunutze, um eine selektive Inhibition eines der beiden Proteine zu erreichen. Hierfür wurde das zu inhibierende Zielprotein molekularbiologisch soweit verändert, dass ein dazu passender Ligand selektiv binden kann. Im Falle der untersuchten Proteine FKBP51 und FKBP52 wurde Phenylalanin, eine große hydrophobe Aminosäure, an Position 67 (FK1-Domäne) gegen Valin getauscht. Die Folge: Es entsteht ein Loch in der Bindungstasche des Liganden. Der zunächst unspezifisch bindende Ligand wurde nun in einer Seitenkette chemisch derart modifiziert, dass er perfekt in das neu generierte Loch passte. Auf diese Weise war es dem veränderten Liganden möglich, das artifizielle, nicht jedoch das wildtyp-Protein, selektiv zu binden und hierdurch zu inhibieren (*Bump and hole*-Strategie) [169].

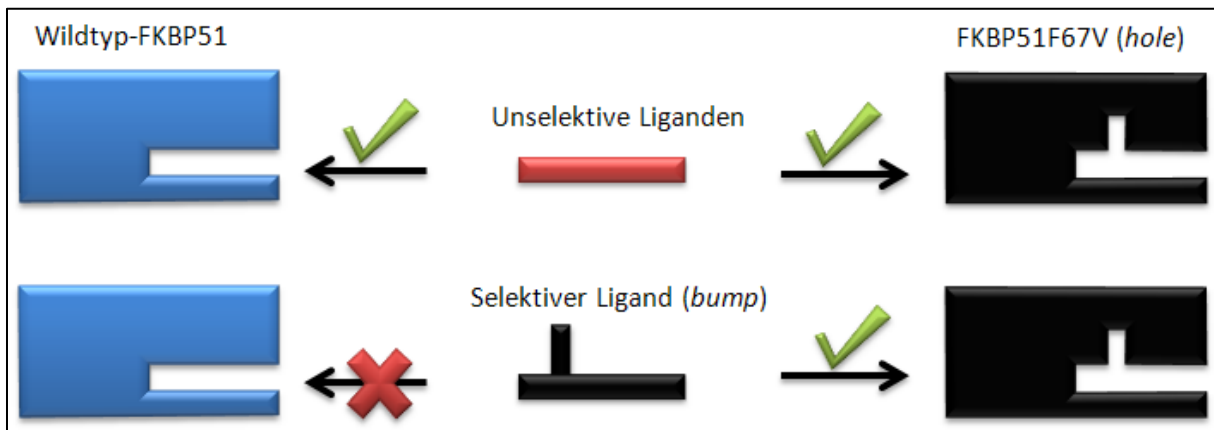


Abbildung 14: Prinzip der „bump and hole“-Strategie. Unselektive Liganden binden sowohl an die Wildtyp-Version als auch die punktmutierte Variante von FKBP51. Selektive Liganden binden hingegen nur noch an die F67V-Mutante.

Um im Anschluss ausschließen zu können, dass die Punktmutation in der FK1-Domäne von FKBP51 einen vom Wildtypen abweichenden Effekt auszulösen vermag, wurde das Neuritenwachstum von FKBP51 sowie von FKBP51F67V überexprimierenden N2a-Zellen detailliert untersucht (siehe Abbildung 15). Es zeigte sich dabei, dass sich das Wildtyp-Protein und die punktmutierte Version bezüglich der Inhibition der N2a-Zelldifferenzierung nahezu identisch verhalten.

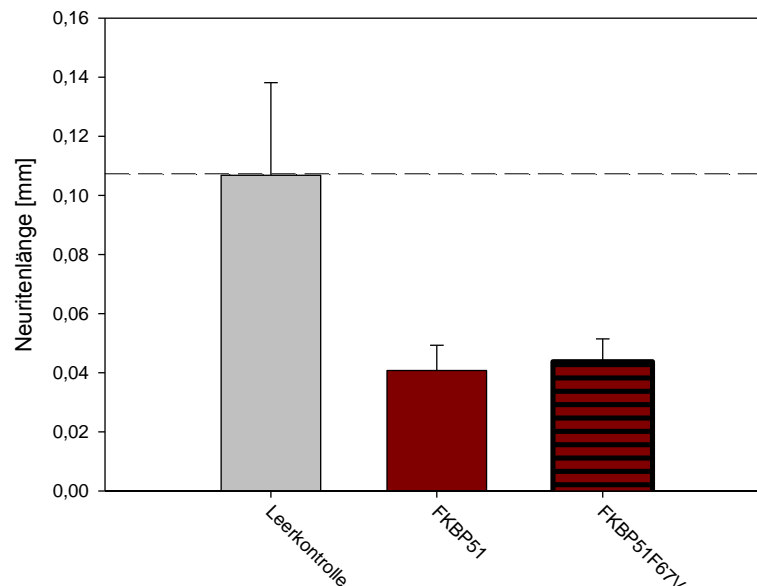


Abbildung 15: FKBP51 und FKBP51F67V inhibieren das Neuritenwachstum von N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor (Leerkontrolle), pRK5-FKBP51 oder pRK5-FKBP51F67V transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium getauscht und damit eine Differenzierung der N2a-Zellen für 48h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

4. Ergebnisse

Um die Bindungseigenschaften an das punktmutierte Protein zu validieren, wurden zunächst *in vitro* Fluoreszenz-Polarisations-Assays durchgeführt (siehe 3.2.3.3). Hierfür wurden zwei unterschiedliche Liganden synthetisiert (LDC43920 und SG466) und auf ihr Selektionsverhalten gegenüber dem Wildtypen und dem von Punktmutanten getestet (Abbildung 16). Es zeigte sich, dass beide Verbindungen sehr potent im nanomolaren Bereich an die mutierten Versionen von FKBP51 und FKBP52 binden und eine 500- bis 1000-fache Selektivität gegenüber den Wildtypen aufweisen. Beide Verbindungen konnten folglich im bereits beschriebenen Neuritenwachstums-Assay genutzt werden, um eines der beiden Proteine selektiv zu hemmen und die Untersuchung der daraus resultierenden Auswirkungen zu ermöglichen.

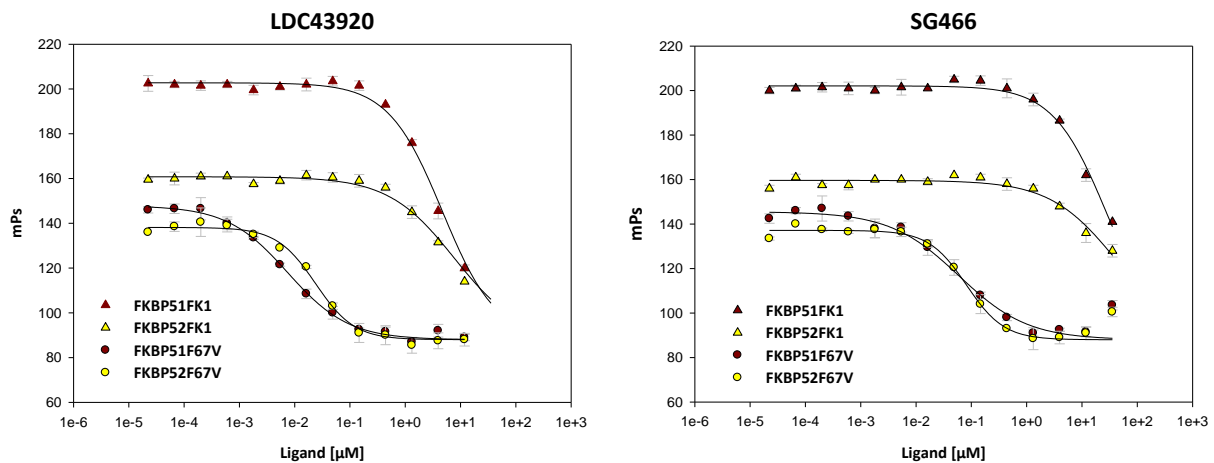


Abbildung 16: Fluoreszenz-Polarisations-Assay zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten von LDC43920 und 2 an FKBP51 /-52 sowie an den entsprechenden Punktmutanten (F67V). Die aufgereinigten FK1-Domänen der Wildtyp-Proteine FKBP51 (2 nM) sowie FKBP52 (2 nM) und F67V-Mutationen (51F67V 2 nM und 52F67V 10 nM) werden durch das Titrieren beider Liganden gegen den Tracer CK97 (3 nM) durch Fluoreszenz-Polarisation gemessen [91]. Der FP-Assay wurde von Dr. Christian Kozany durchgeführt.

Ligand	FKBP51 wt	FKBP51F67V	FKBP52 wt	FKBP52F67V
LDC43920	4,7 ± 1,4	0,01 ± 0,001	7,7 ± 5,8	0,024 ± 0,003
SG466	>30	0,06 ± 0,03	>40	0,08 ± 0,02

Tabelle 15: Bindungsaffinitäten (IC_{50} in μM) der LDC43920 und SG466 an FKBP51, FKBP51F67V, FKBP52 und FKBP52F67V [91].

Im nächsten Schritt wurden N2a-Zellen mit FKBP51, FKBP51F67V sowie einer Leerkontrolle transfiziert und zusätzlich mit den LDC43920 oder SG466 behandelt. Erneut wurde das

4. Ergebnisse

Differenzierungsverhalten der Zellen durch FKBP51 sowie durch die Punktmutant deutlich inhibiert. Durch Gabe eines der beiden Inhibitoren konnte, wie erwartet, im Falle des Wildtyp-Proteins keine Veränderung auf das Differenzierungsverhalten der N2a-Zellen festgestellt werden. Sowohl jene Zellen, die mit LDC43920 als auch solche, die mit SG466 behandelt wurden, änderten im Falle der Überexpression von FKBP51 ihr Differenzierungsmuster nicht. Das Neuritenwachstum wurde von FKBP51 inhibiert. Dies änderte sich jedoch deutlich bei der Expression von FKBP51F67V. Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, konnten beide Inhibitoren (LDC43920 oder SG466) die durch FKBP51F67V hervorgerufene Hemmung komplett aufheben. Die Länge der gebildeten Neuriten entsprach denen, der mit einem Leervektor transfizierten Kontrollen. Es konnte somit erstmals bewiesen werden, dass die von FKBP51 hervorgerufenen Effekte durch gezielte pharmakologische Inhibition des Zielproteins blockiert werden können. In weiteren Versuchen stand nun die Frage im Vordergrund, ob die Bindung an FKBP51F67V und die damit verbundene Inhibition von FKBP51F67V sowie deren Effekt dosisabhängig im Bezug auf den zugegebenen Liganden ist. Hierzu transfizierten wir N2a-Zellen erneut mit dem pRK5-FKBP51F67V-Konstrukt und titrierten den SG466 (1 nM bis 10 µM). Wie in Abbildung 18 zu sehen, konnte der Effekt des Proteins dosisabhängig aufgehoben werden. Der Einsatz von 100 nM SG466 führte bereits zu einer kompletten Aufhebung der durch FKBP51F67V ausgelösten Reduktion der Neuriten. Dieses Ergebnis korrespondiert mit den im Fluoreszenz-Polarisations-Assay erhaltenen Bindungsaffinitäten von SG466 an FKBP51F67V (siehe Tabelle 15).

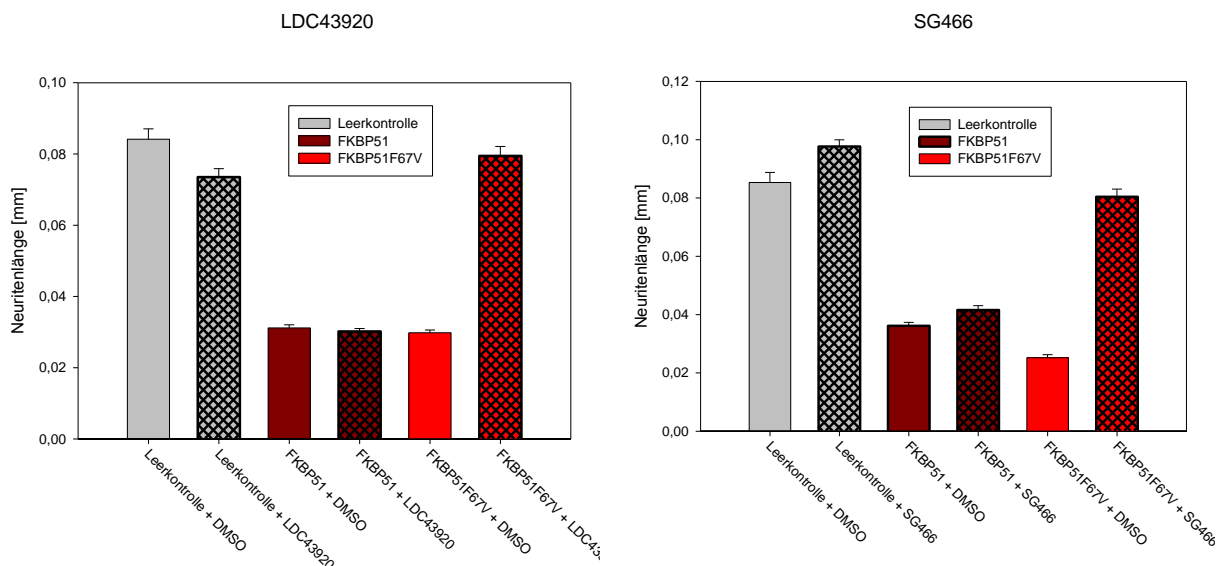


Abbildung 17: Die Inhibition von FKBP51F67V kann im Gegensatz zu der Inhibition durch FKBP51 sowohl durch LDC43920 als auch SG466 aufgehoben werden. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor (Leerkontrolle), pRK5-FKBP51 oder pRK5-FKBP51F67V transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive LDC43920 oder SG466 (20 µM) beziehungsweise DMSO, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 48h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die

4. Ergebnisse

Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

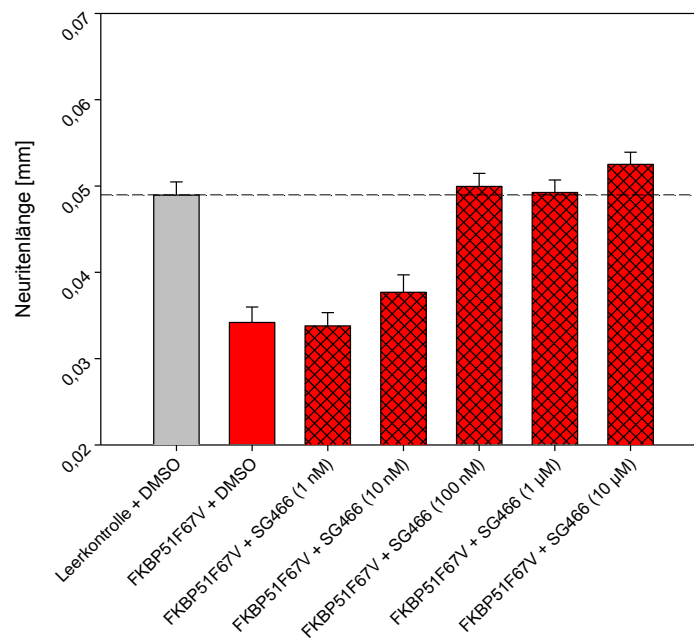


Abbildung 18: Die Inhibition von FKBP51F67V durch den Liganden ist dosisabhängig. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-FKBP51F67V transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive SG466 beziehungsweise DMSO, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 48h ausgelöst. Der Ligand wurde hierbei titriert (1 nM – 10 µM). Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

Um im Fortgang der Forschung zu überprüfen, ob eine Inhibition von FKBP5s generell über die Blockade der aktiven Tasche in der FK1-Domäne hervorgerufen werden kann, mutierten wir neben FKBP51 ebenfalls die Position 67 in FKBP52. Abermals wurde ein Phenylalanin gegen Valin ausgetauscht. Das Ergebnis: Das Bindungsverhalten beider Liganden gegenüber der Punktmutante und des Wildtyp-Proteins entspricht den Selektivitäten wie bereits für FKBP51 beschrieben. Beide binden deutlich selektiver an die Punktmutante. Auch der durch FKBP52 ausgelöste, bereits beschriebene Effekt (Förderung des Neuritenwachses, siehe Abbildung 10) konnte durch beide Liganden aufgehoben werden. Das Versetzen von Wildtyp-FKBP52 überexprimierenden Zellen mit SG466 hatte dagegen keinen Effekt. Vergleicht man dies mit dem Verhalten der N2a-Zellen, die FKBP52F67V exprimieren, so wird deutlich, dass SG466 in der Lage ist, erfolgreich an die FK1-Domäne zu binden, FKBP52 zu inhibieren und damit den durch FKBP52 verstärkten Effekt bezogen auf das Differenzierungsverhalten der Zellen zu unterdrücken (Abbildung 19). Wie schon weiter oben ausgeführt, ist es ebenfalls möglich, den durch FKBP51 beziehungsweise FKBP52 hervorgerufenen Effekten durch das Austitrieren eines der beiden Proteine mit dem jeweils anderen entgegenzuwirken.

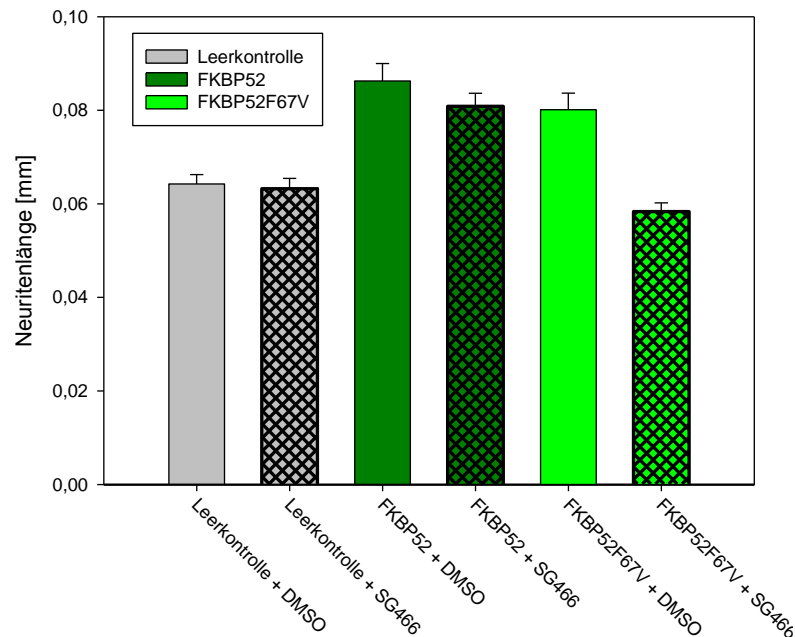


Abbildung 19: Der neuritenwachstumsfördernde Effekt von FKBP52F67V kann im Gegensatz zu dem des Wildtyp-Proteins durch den Einsatz von SG466 aufgehoben werden. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor (Leerkontrolle), pRK5-FKBP52 oder pRK5-FKBP52F67V transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive SG466 (20 μ M) beziehungsweise DMSO, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 48h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

Mit Hilfe der *bump-and-hole*-Strategie wurde als endgültiger Beweis des antagonistischen Verhaltens beider Proteine schließlich ein weiterer Neuritenwachstums-Assay durchgeführt, in dem sowohl die Wildtyp-Variante beider Proteine als auch deren Punktmutation exprimiert wurden. Dabei wurde stets eine der beiden Versionen von FKBP51 mit einer der beiden Versionen von FKBP52 (Wildtyp oder F67V-Mutation) transfiziert. Weiter wurden die Zellen entweder nur mit DMSO als Kontrolle oder mit SG466 behandelt (Abbildung 20). Sowohl bei der gleichzeitigen Überexpression der Wildtypen als auch bei der Transfektion beider Punktmutanten konnte kein signifikanter modulatorischer Effekt von SG466 bezüglich der Länge der ausgebildeten Neuriten festgestellt werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Inhibitor entweder gar nicht oder vollständig an beide Proteine (51 und 52) binden konnte und diese im Umkehrschluss entweder nicht oder gleichzeitig inhibierte. Ergo hoben sich die Effekte von FKBP51 und FKBP52 gegenseitig auf und es kam zu einem Differenzierungsverhalten, das vergleichbar mit dem der Leertransfektionen war. Wurde jedoch eine Kombination beider Proteine gewählt, in der eine Mutante und ein Wildtyp eingesetzt wurden, so konnte jeweils die Punktmutante erfolgreich inhibiert werden, der gegensätzliche Wildtyp allerdings nicht. Im Falle der Expression von FKBP52F67V und FKBP51 kam es durch Gabe des Inhibitors zu einem verminderten Auswuchs der N2a-Zellen, während die Blockade

4. Ergebnisse

von FKBP51F67V in Kombination mit FKBP52 eine verstärkte Ausbildung von Neuriten zur Folge hatte. Dies zeigt erstmals, dass die selektive Blockade einer der beiden FKBP-Varianten signifikante Effekte auf die Neuritogenese hat und unterstreicht dadurch das neurotrophe Potential einer selektiver Inhibition von FKBP51 in Neuronen.

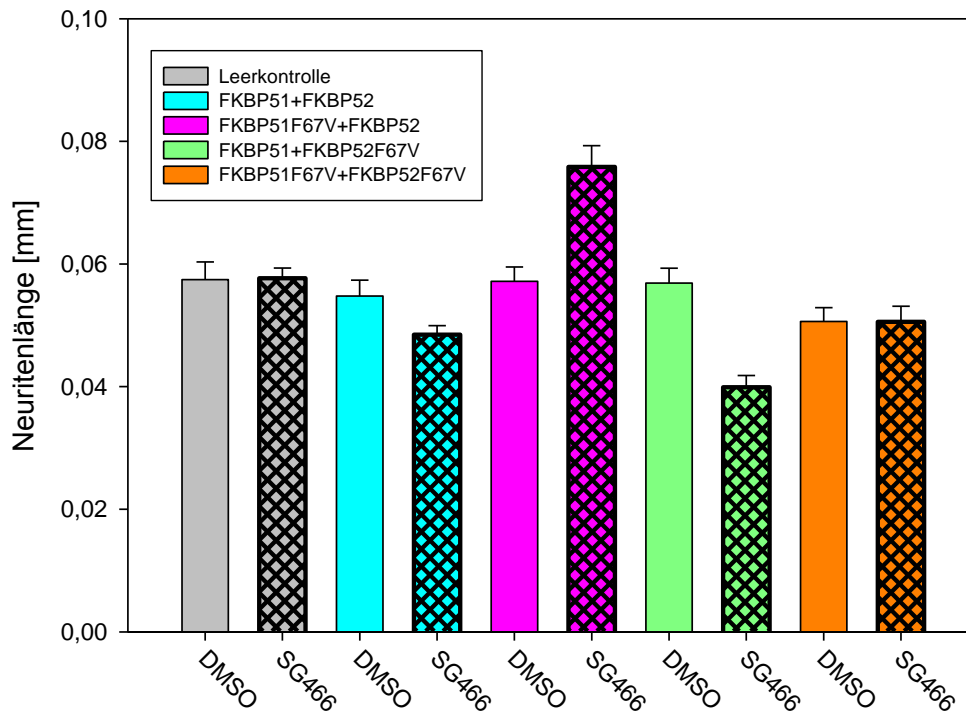


Abbildung 20: Inhibition der durch die Punktmutanten ausgelösten Effekte durch SG466. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie einer Kombination aus 720 ng pRK5-FKBP51 und pRK5-FKBP52 (wt/wt, wt/pm oder pm/pm) oder pRK5-Leervektor (Leerkontrolle) transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive des SG466 (20 μ M) beziehungsweise DMSO, getauscht und damit eine Differenzierung der N2a-Zellen für 48h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

4.4 Die Modulation des Differenzierungsverhaltens von N2a-Zellen durch Steroide

Erstmals konnte im Rahmen der wissenschaftlichen Forschung belegt werden, dass Co-Chaperone wie FKBP51 und FKBP52 nicht nur einen wichtigen modulatorischen Effekt auf das Neuritenwachstumsverhalten von Neuroblastoma-Zellen ausüben, sondern auch, dass dieser Effekt durch Inhibitoren pharmakologisch blockiert werden kann. Nun galt es herauszufinden, wie FKBP5s das Differenzierungsverhalten von neuronalen Zellen auf biochemischer und molekularbiologischer Stufe regeln und somit möglicherweise einen Einfluss auf die Neuroplastizität von Organismen nehmen.

Einer der prominentesten Effekte von FKBP51 ist seine inhibitorische Wirkung auf Steroidhormonrezeptoren. Das Protein agiert in diesem Fall zusammen mit Hsp90 als Co-Chaperon für besagte Heterokomplexe. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass es Signale, die sowohl vom GR [82] wie auch vom MR [170] ausgehen, negativ und solche, die vom AR ausgehen, zelltyp-abhängig positiv reguliert [171]. Weiter ist erwiesen, dass FKBP51 nicht nur regulatorisch wirkt, sondern dessen Expression auch unter Kontrolle genau dieser Rezeptoren steht [172]. Es handelt sich hierbei um eine klassische intrazelluläre, negative Rückkopplung. FKBP51 kann hierdurch als regulatorische Schnittstelle für unterschiedliche Signalwege fungieren.

Inspiziert von der Tatsache, dass FKBP51 und FKBP52 bereits als wichtige Interakteure in steroidalen Signalkaskaden beschrieben wurden, stellten wir uns die Frage, ob Steroide ebenfalls einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von N2a-Zellen haben. Im Kontext der hormonellen Stressantwort des Körpers (HPA-Achse) sind hierbei vor allem zwei Rezeptoren von besonderer Bedeutung: Die nach Stress sekretierten Glucocorticoide sind in der Lage, an endogene Glucocorticoid- sowie an Mineralcorticoid-Rezeptoren zu binden und auf diese Art einen negativen Rückkopplungsmechanismus der HPA-Achse auszulösen. Im Rahmen dessen spielen vor allem die Rezeptoren, die in Hypothalamus, Hypophyse und Hippocampus angesiedelt sind, eine wichtige Rolle [173]. Uns interessierten daher vor allem Differenzierungseffekte, welche genau durch diese beiden Proteine reguliert werden. In einem ersten Versuch testeten wir daher, ob Liganden unterschiedlicher Steroidhormon-Rezeptoren einen Effekt auf das Differenzierungsverhalten von Neuro-2a-Zellen ausüben. Hierfür setzten wir zum einen die Agonisten Aldosteron, Dexamethason und Dihydrotestosteron (DHT) und zum anderen die Antagonisten Ru486 und Spironolacton ein. Weiter gingen wir der Frage nach, ob Hsp90-Inhibitoren und Inhibitoren des P-glycoproteins (P-gp) ebenfalls in der Lage sind, das Differenzierungsverhalten zu modulieren. Wie Abbildung 21 zu entnehmen ist, bewirken die MR- wie auch GR-Agonisten Aldosteron und Dexamethason einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum der Neuriten, während der Androgenrezeptor-Agonist keine

signifikante Änderung des Differenzierungsverhaltens zur Folge hat. Die Antagonisten, nämlich Ru486 und Spironolacton, lösen hier einen gegenteiligen Effekt aus. Sie inhibieren die Differenzierung der Neuro-2a-Zellen. Diese Ergebnisse deuten erstmals darauf hin, dass SHRs einen zentralen Einfluss auf die Entwicklung neuronaler Zellen nehmen. Der Einsatz von Geldanamycin, welches Hsp90 inhibiert und dadurch die korrekte Formierung der SHR-Heterokomplexe in einen aktivierbaren Zustand verhindert, führt zu Ergebnissen, die mit denen der Antagonisten zu vergleichen sind. Auch hier wird die Bildung neuer Neuriten gestört und dadurch die These der SHR-Involvierung in neuronale Entwicklungsprozesse gestützt. Als Nächstes gingen wir der Frage nach, ob durch eine Blockade des P-gps eine Erhöhung der intrazellulären Steroidkonzentration und somit eine Änderung des Entwicklungsverhaltens der Zellen hervorgerufen werden kann. Hierbei stellten wir allerdings nur eine minimale Änderung fest, die jedoch auch den geringen Inhibitor-Konzentrationen im Assay geschuldet sein könnte.

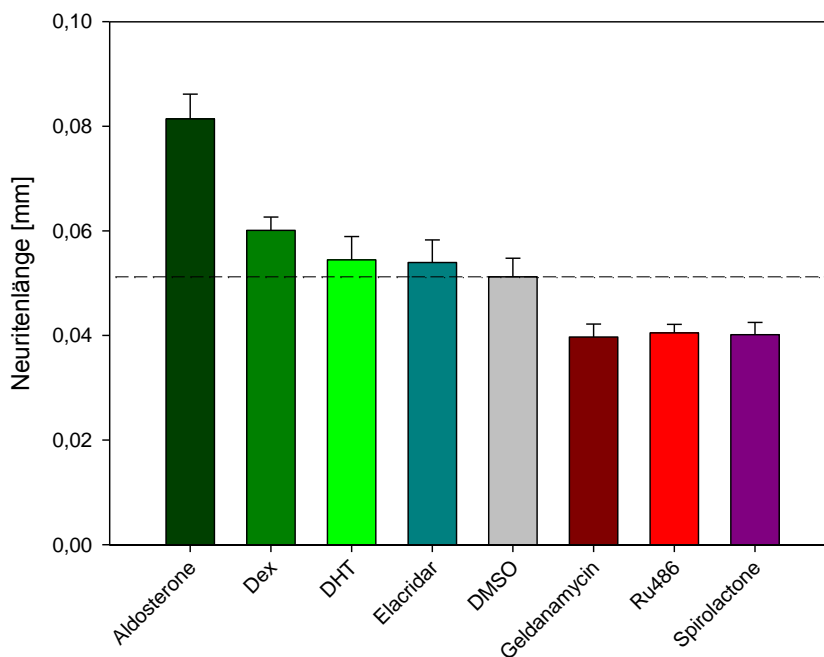


Abbildung 21: Effekt unterschiedlicher Steroide und Inhibitoren von Hsp90 und P-gp auf das Neuritenwachstum von N2a-Zelle. N2a-Zellen wurden jeweils mit myr-Venus sowie pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive 20 nM der angegeben Verbindung, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

In der Familie der Steroidhormonrezeptoren weisen der GR und der MR die höchste Homologie auf. Dies führt dazu, dass Liganden, die an einen der beiden Rezeptoren binden, meist auch eine gewisse Affinität für den jeweils anderen Rezeptor aufweisen. Endogene Corticosteroide binden meist mit höherer Affinität an den MR als an den GR [174]. Bei der Wahl geeigneter Agonisten sowie Antagonisten wurde daher besonders auf eine möglichst hohe Selektivität gegenüber dem jeweils anderen Rezeptor geachtet.

Zunächst untersuchten wir Effekte auf Differenzierungsebene von Agonisten beider Rezeptoren. Hierbei setzten wir für den MR Aldosteron sowie Ru26988 für den GR ein. Die Zellen wurden zunächst, wie in Kapitel 3.3.1.2 beschrieben, ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium gegen Differenzierungsmedium getauscht und eines der beiden Steroide zugesetzt. Um Aussagen über pharmakodynamische Prozesse machen zu können, wurden beide Steroide titriert und deren Effekte zwischen 0 und 1 μM untersucht. Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, übt Aldosteron in niedrigeren Dosen zunächst einen neuritenfördernden Effekt aus. In einem dosisabhängigen Verhalten bilden N2a-Zellen, die mit 3-100 nM Aldosteron versetzt wurden, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle deutlich längere Neuriten aus. Dies gilt bis zu einer maximalen Konzentration von 100 nM. Wird der Gehalt an Steroid nun sukzessive weiter erhöht, so verringern sich die Absolutlängen wieder und gehen ab einer Konzentration von 1 μM sogar auf Basalniveau zurück. Dieser Effekt überraschte zunächst, da im Falle von Stimulatoren der Differenzierung eine klassische Dosis-Wirkungs-Kurve mit einem maximalen Plateau zu erwarten war.

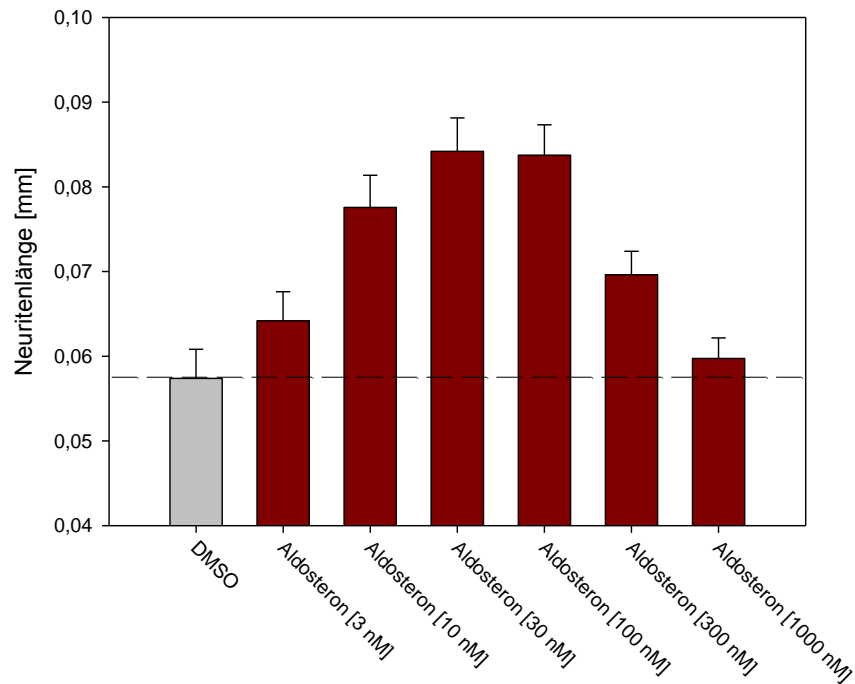


Abbildung 22: Aldosteron fördert das Neuritenwachstum von N2a-Zellen bis 100 nM. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive Aldosteron in entsprechender Konzentration, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

Um den Einfluss von Steroiden, speziell Agonisten, weiter zu beleuchten, führten wir ein ähnliches Experiment mit GR-selektiven Agonisten durch. Zu diesem Zweck untersuchten wir zum einen den Effekt von Ru26988, einem traditionellen Steroid, sowie den des nicht-steroidalen GR-Liganden R-16 [175]. Sowohl Ru26988 als auch R-16 zeigten ein ähnliches differenzierungsförderndes Profil wie Aldosteron. Beide wirken bis zu einer Konzentration von 100 nM positiv auf die Bildung von Neuriten. Wird eine höhere Konzentration eingesetzt, beginnen N2a-Zellen abermals kürzere Neuriten zu bilden, wobei sie nie unter das Ausgangsniveau fallen. Der Rückgang der Neuritenbildung scheint auch in diesem Fall in dosis-abhängiger Weise zu erfolgen, sodass ab 300 nM zunächst ein leichter Rückgang zu verzeichnen ist, während eine Konzentration von 1 μ M im Medium zum Erreichen des Basallevels führt. Hier ist jedoch interessant, dass die steroidale Verbindung Ru26988, die im Falle des GRs sowohl als Transaktivator wie auch als Transrepressor wirkt, einen deutlich stärkeren Effekt als das primär als Transrepressor agierende R-16 ausübt.

4. Ergebnisse

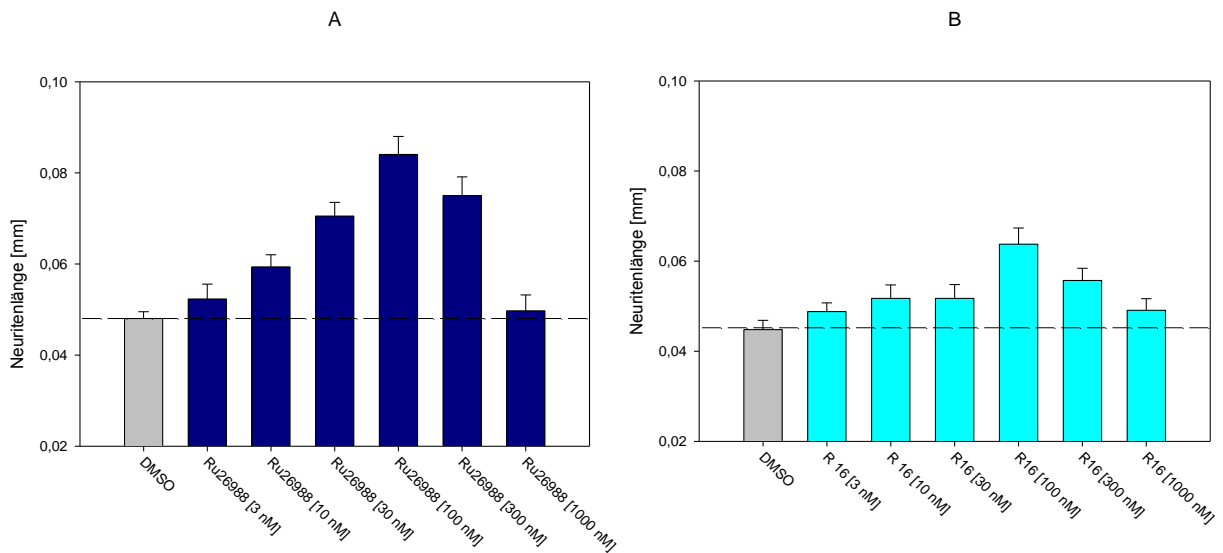


Abbildung 23: Sowohl Ru26988 (A) als auch R-16 (B) fördern das Neuritenwachstum von N2a-Zellen bis 100 nM. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive der GR-Agonisten in entsprechender Konzentration, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

Nachdem wir wissenschaftlich belegen konnten, dass Agonisten einen differenzierungsfördernden Effekt ausüben, stellten wir uns die Frage, ob Antagonisten dieser Rezeptoren einen entgegen gerichteten Effekt bewirken. Um diese Frage beantworten zu können, führten wir ein ähnliches Experiment mit selektiven Antagonisten für den MR (Ru28318) sowie den GR (CORT108297 und Ru486) durch (Abbildung 24). Zusätzlich überprüften wir die MR-Antagonisten Eplerenon und Spironolacton. Konsistent mit den Ergebnissen aus den Agonisten-Versuchen zeigten diese Antagonisten einen inversen Effekt auf die Bildung von Neuriten. Sowohl Ru28318, Spironolacton, Eplerenon, Ru486 wie auch CORT108297 führten dosisabhängig zu einem verminderten Differenzierungspotenzial der N2a-Zellen. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass Steroidhormonrezeptoren eine wichtige Funktion auf das Entwicklungsverhalten von neuronalen Zellen einnehmen. Agonisten lösen eine verstärkte, Antagonisten dieser Rezeptoren eine verminderte Ausbildung von Neuriten aus.

4. Ergebnisse

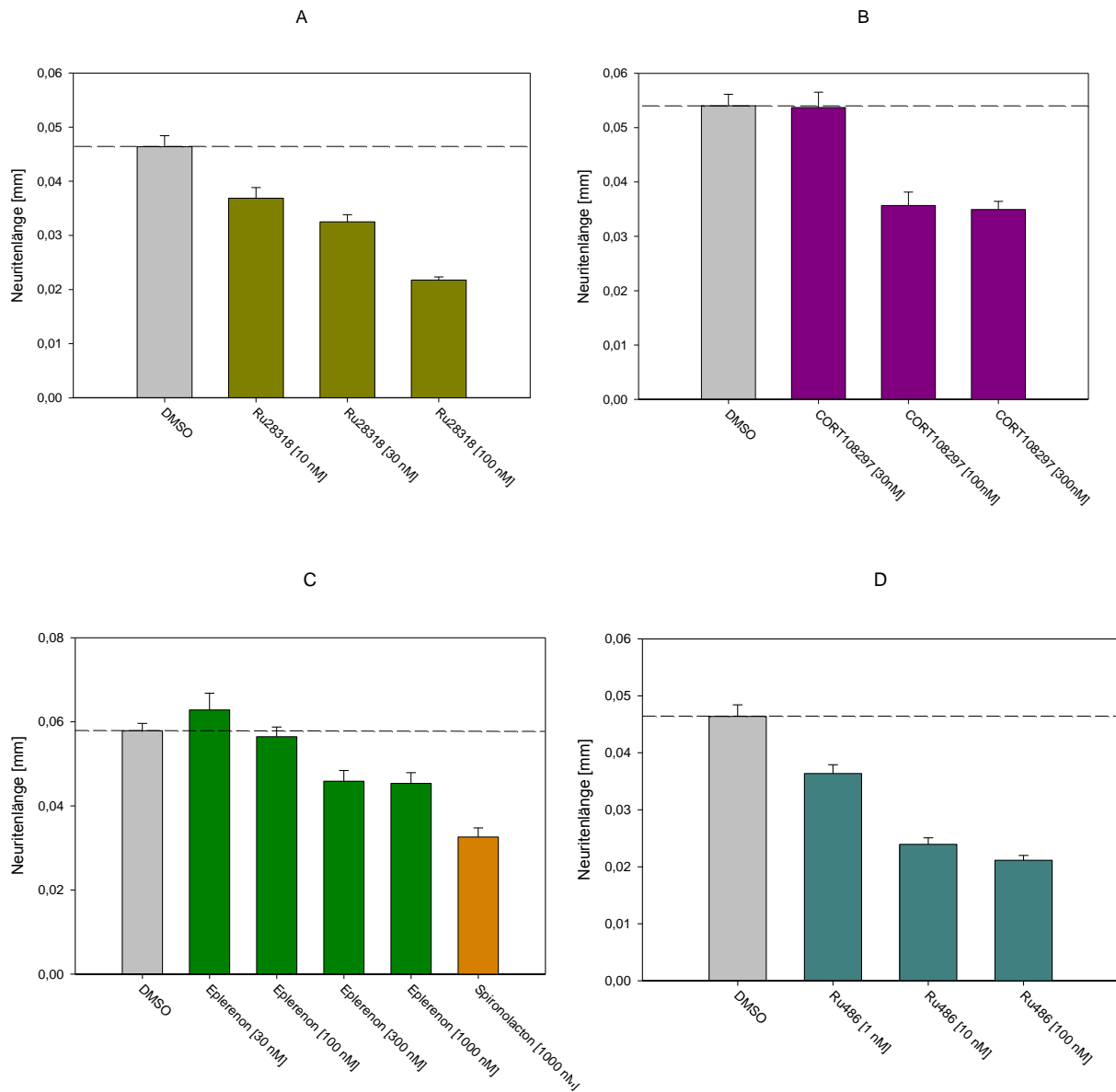


Abbildung 24: Sowohl Ru28318 (A), CORT108297 (B), Eplerenon und Spironolacton (C) als auch Ru486 (D) inhibieren das Neuritenwachstum von N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive Steroide in entsprechender Konzentration, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

Im Folgenden untersuchten wir die Fragen, ob und in wieweit die durch Überexpression von FKBP51 ausgelösten Inhibitions-Effekte durch Agonisten aufgehoben werden können und welche Effekte Antagonisten in diesem Kontext bewirken. Hierfür wurden N2a-Zellen entweder mit dem pRK5-Leervektor oder pRK5-FKBP51 transfiziert und mit der effektivsten Wirkkonzentration des

entsprechenden Liganden behandelt. Wie in Abbildung 25 zu sehen, wurde sowohl durch den MR-Agonisten (A) wie auch den GR-Agonisten (B) der durch FKBP51 verursachte inhibierende Effekt größtenteils aufgehoben. Bei Steroidgabe erreichten die Absolutlängen der FKBP51-überexprimierenden Zellen beinahe das Niveau der Kontroll-transfizierten Zellen und lagen deutlich über dem Basalwert. Im Falle der Antagonisten des MRs (C) und GRs (D) wurde in beiden Fällen eine deutliche Abnahme der Neuritenlängen durch die Antagonisten evident. FKBP51 konnte in diesem Fall kein signifikanter zusätzlicher Effekt nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass zum einen Agonisten in ihrer Inhibition des Neuritenwachses FKBP51 dominieren und dass zum anderen FKBP51 keine additiven Effekte auf den Wirkmechanismus der Antagonisten ausübt, lässt darauf schließen, dass neben den Effekten durch Steroidhormonrezeptoren-Signalwegen auch andere Prozesse an der Modulation beteiligt sein könnten. Eine genauere Erläuterung ist dem Kapitel 5.2 zu entnehmen.

4. Ergebnisse

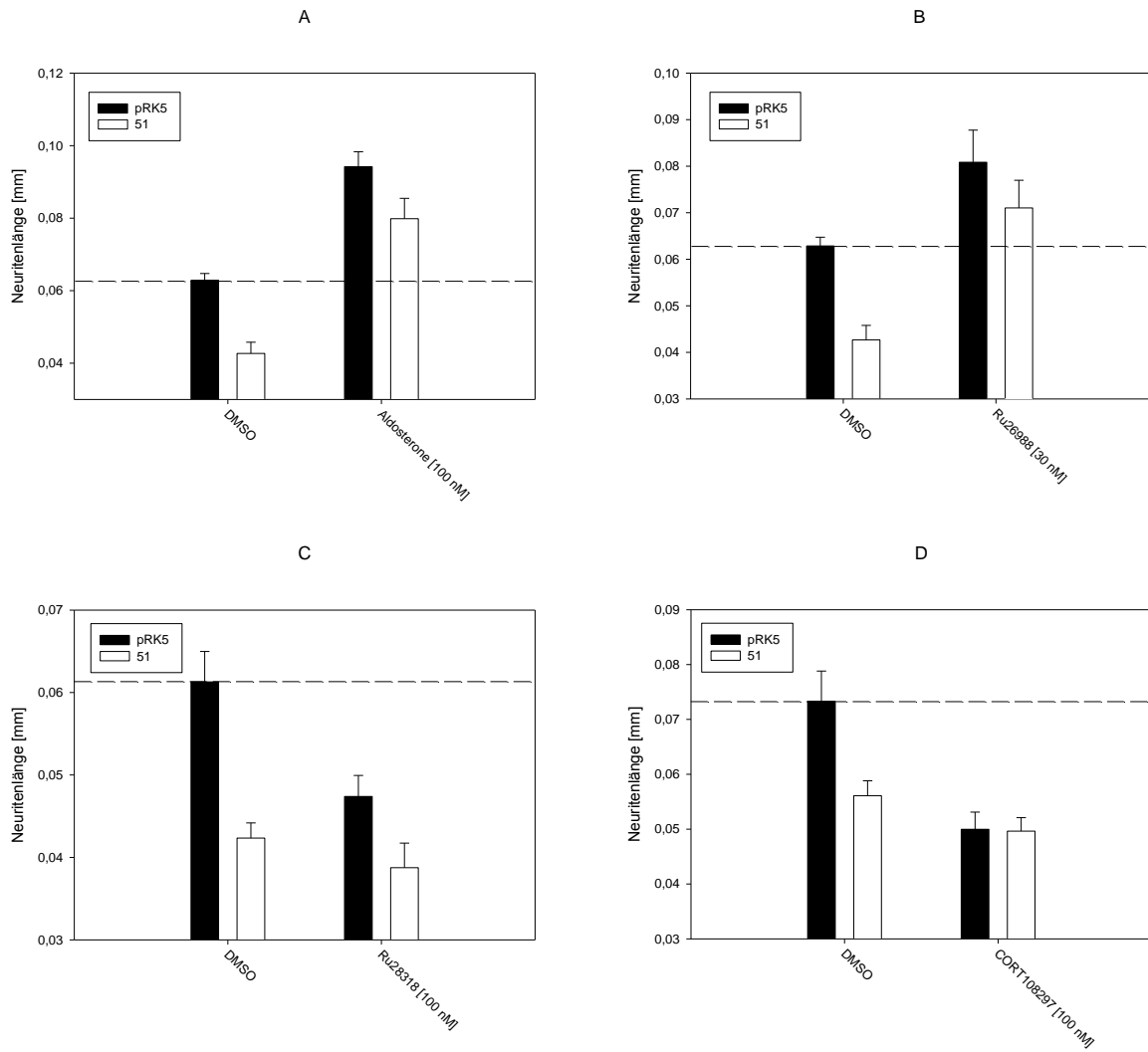


Abbildung 25: Effekte von Agonisten (Aldosteron (A), Ru26988 (B)) und Antagonisten (Ru28318 (C), CORT108297 (D)) des MRs beziehungsweise GRs in FKBP51 überexprimierenden Zellen: N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor oder pRK5-FKBP51 transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive Steroid in entsprechender Konzentration, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

4.5 Der Einfluss von FKBP51-Inhibitoren auf die Signaltransduktion von Steroidrezeptoren

FKBP51 ist in der Lage, Steroidhormon-Rezeptoren negativ zu modulieren. Über dieses zentrale Ergebnis heraus, konnten wir jedoch zusätzlich zeigen, dass durch eine selektive Blockade von FKBP51, nämlich der Inhibition von FKBP51F67V (vergleiche auch Kapitel 4.3), auch eine Änderung des Differenzierungsverhalten von Neuro-2a-Zellen ausgelöst werden kann. Dies bewies jedoch nicht, dass besagter Mechanismus ein Resultat der geänderten SHR-Signale durch FKBP51 ist. Daher galt es nun zu überprüfen, ob eine selektive Blockade von FKBP51 speziell solche Signalwege beeinflussen kann. Um einen solchen Nachweis zu erbringen etablierten wir zunächst einen Radioaktiv-Bindungsassay, der die Messung der Ligandenbindung von Dexamethason an den Glucocorticoidrezeptor ermöglichte (siehe auch Abschnitt 3.3.2). Im Anschluss wurden Lysate aus GR-überexprimierenden HEK-Zellen hergestellt, welche mit unterschiedlichen rekombinanten FKBP51s, die wir wiederum *in-vitro* aufreinigten, versetzt wurden, um die Bindung von radioaktiv markierten Dexamethason an den GR messen zu können. Um außerdem überprüfen zu können, ob der gemessene Effekt tatsächlich auf FKBP51 beruht, reinigten wir ein weiteres, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, deutlich potenteres Homolog von FKBP51 aus dem Totenkopfflächen auf (smFKBP51) und testeten auch dieses. Neben dieser Variante von FKBP51 bezogen wir unsere Untersuchungen darüber hinaus auf den Effekt von FKBP52 innerhalb unseres Assays. Hierfür wurde zusätzlich humanes FKBP52 gereinigt und getestet.

In einem ersten Versuch versetzten wir die GR-haltigen Lysate mit den Immunophilinen FKBP51 und FKBP52. Zudem interessierte uns, ob Substanzen, die unterschiedliche Effekte auf den SHR-Heterokomplex auslösen, auch in unserem Assay eine signifikante Wirkung zeigen. Hierfür testeten wir die Einflüsse von Molybdat und Radicol. Ersteres kann den ATP-gebundenen Zustand von Hsp90 und dadurch die Heterokomplex-Konformation, welche potent Dexamethason zu binden fähig ist, stabilisieren [176, 177]. Radicol hingegen vermag als Hsp90-Inhibitor die Komplexbildung zu verhindern [178]. Auch in unserem Assay konnten solche Effekte beobachtet werden. Der Einsatz von Molybdat führte zu einer leichten Steigerung der Bindung von radioaktiv-markiertem Dexamethason, während Radicol diese komplett aufhob. Die Bindungswerte sind in letzterem Fall mit denen der Kompetitionswerte, die durch einen starken Überschuss an untritiertem Dexamethason generiert wurden, vergleichbar. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die im Radioaktiv-Bindungsassay erhaltenen Daten tatsächlich von der Formierung und der Aktivität des SHR-Heterokomplexes abhängig waren. Auch der Einsatz von SHR-modulierenden Immunophilinen hatte einen Effekt auf die Ligandenbindungsaffinität des Rezeptorkomplexes. Durch die Verwendung

von FKBP51 wurde wie erwartet die Bindung zu Dexamethason herabgesetzt, während FKBP52 diese leicht verbesserte (siehe Abbildung 26).

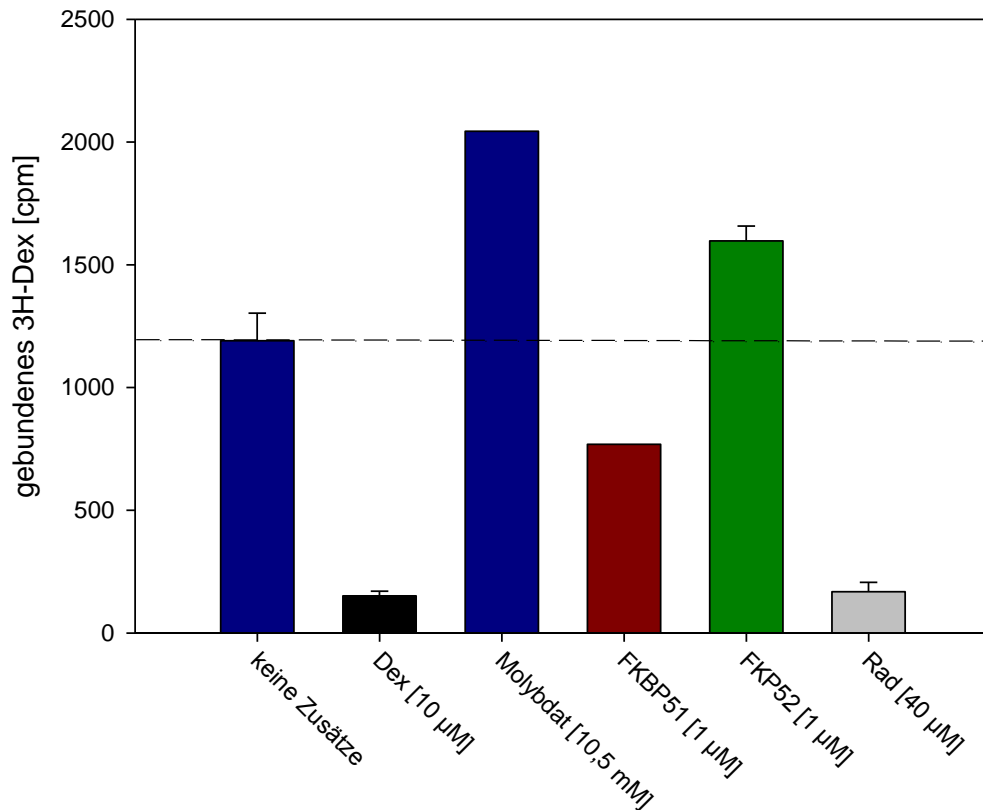


Abbildung 26: Effekte von Molybdat, FKBP51, FKBP52 und Radicicol auf den GR. GR überexprimierende HEK-Zelllysate wurden mit 10 µM Dexamethason (Kompetition), 10,5 mM Natriummolybdat, 40 µM Radicicol oder 1 µM humanem FKBP51 bzw. FKBP52 inkubiert und mit 10 nM radioaktiven Dexamethasons behandelt. Anschließend wurde nicht gebundenes Dexamethason durch eine Absorption an Aktivkohle entfernt und die verbleibende Menge an GR gebundenen Dexamethasons gemessen.

In weiteren Versuchen wurden die Effekte der Immunophiline näher untersucht. Hierfür wurden komplette Bindungskurven verschiedener Konzentrationen von 3H-Dexamethason aufgenommen und vermessen. Dies lässt eine Bestimmung von K_d - wie auch B_{max} -Werten zu. Zunächst wurden die Effekte von humanem FKBP51 und FKBP52 sowie der FKBP51 Variante des Totenkopffähchens untersucht (smFKBP51). Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, verminderte FKBP51 die Bindung des Liganden an den Rezeptor deutlich. Weiter ließ sich die Erwartung bestätigen, dass smFKBP51 diese Interaktion noch stärker zu inhibieren vermochte. In beiden Fällen wurde ein signifikanter Anstieg des K_d -Werts gemessen. FKBP52 hingegen führt zu keiner Änderung des K_d -Werts. Es bewirkt dagegen eine geringe Absenkung des B_{max} -Werts (Abbildung 28).

4. Ergebnisse

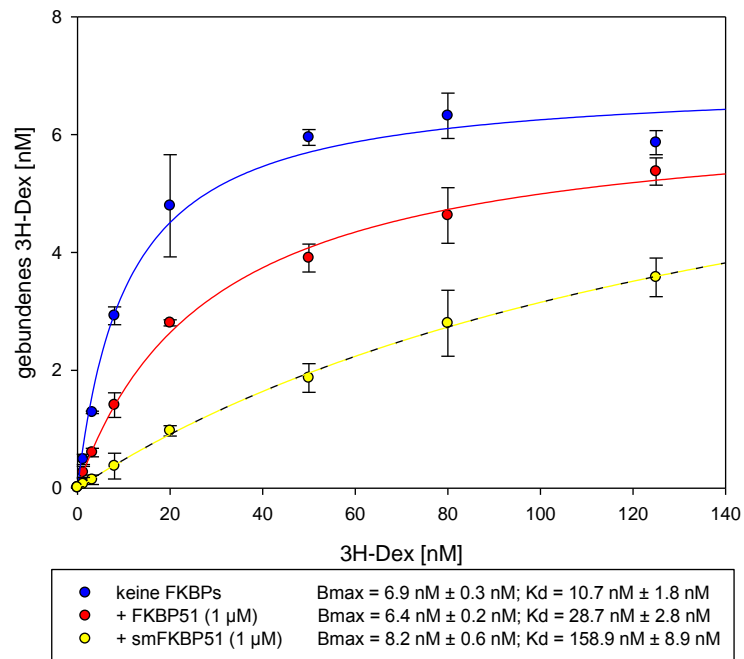


Abbildung 27: FKBPs inhibieren die Bindung von radioaktiv-markierten Dexamethason an den Glucocorticoidrezeptor. GR überexprimierende HEK-Zelllysate wurden mit 1 µM humanem FKBP51 sowie smFKBP51 inkubiert und mit unterschiedlichen Mengen radioaktiven Dexamethasons behandelt. Anschließend wurde nicht gebundenes Dexamethason durch eine Absorption an Aktivkohle entfernt und die verbleibende Menge des an GR gebundenen Dexamethasons gemessen.

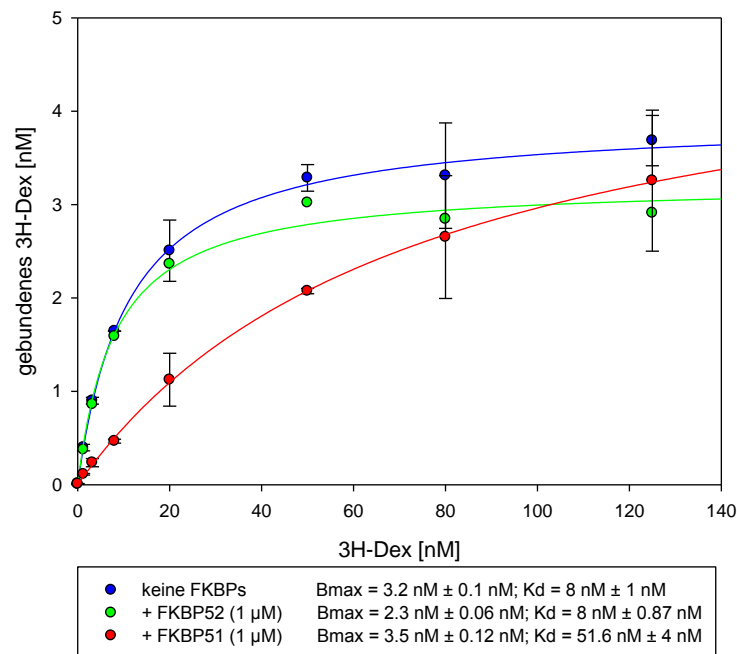


Abbildung 28: FKBP51 und FKBP52 beeinflussen die Bindung von radioaktiv-markierten Dexamethason an den Glucocorticoidrezeptor unterschiedlich. GR überexprimierende HEK-Zelllysate wurden mit 1 µM humanem FKBP51 sowie FKBP52 inkubiert und mit unterschiedlichen Mengen radioaktiven Dexamethasons behandelt. Anschließend wurde nicht gebundenes Dexamethason durch eine Absorption an Aktivkohle entfernt und die verbleibende Menge des an GR gebundenen Dexamethasons gemessen.

Um zu überprüfen, ob besagte Effekte konzentrationsabhängig in Bezug auf die jeweils eingesetzten Proteine auftreten, wurden zusätzliche Radioaktiv-Bindungsassays umgesetzt, in denen eine gegebene Menge GR-Lysat mit einer konstanten Konzentration an radioaktiv-markierten Dexamethason versetzt wurde. Anschließend wurden FKBP5s hinzutitriert. Wie Abbildung 29 zu entnehmen ist, inhibieren beide FKBP51-Varianten die Bindung von Dexamethason an den GR in einem deutlich dosisabhängigen Verhalten. smFKBP51 zeigt sich dabei abermals potenter als hFKBP51.

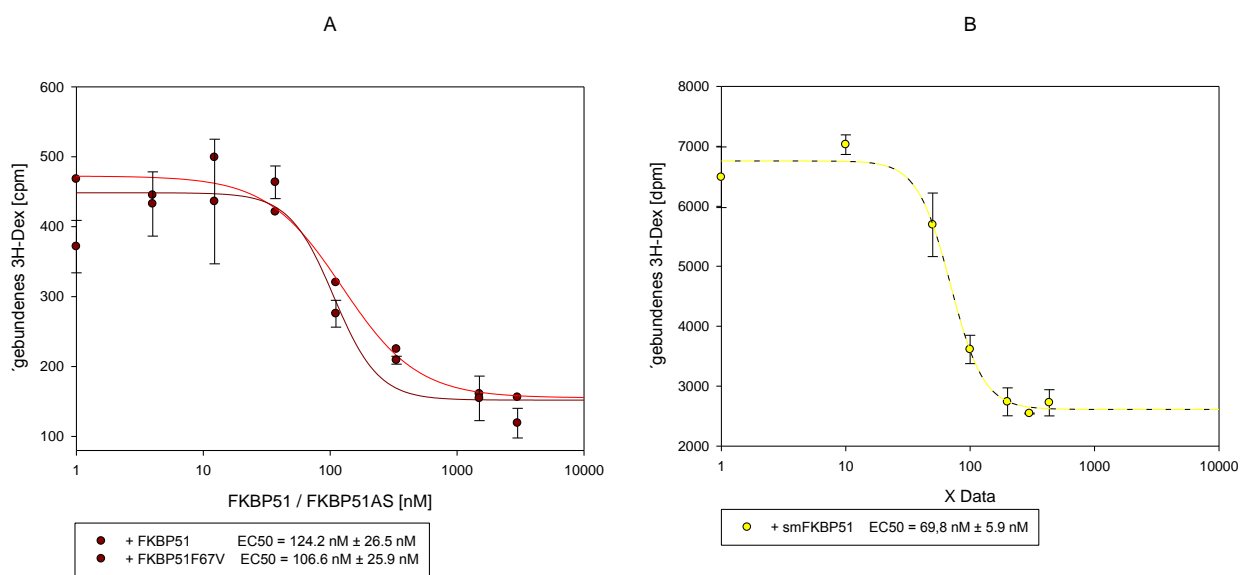


Abbildung 29: Titration von FKBP51, FKBP51F67V und smFKBP51 im Radioaktiv-Bindungsassay bei konstanten GR-Konzentrationen. GR überexprimierende HEK-Zelllysate wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an humanem FKBP51 sowie dessen F67V-Mutante und smFKBP51 inkubiert und 10 nM radioaktiven Dexamethasons behandelt. Anschließend wurde nicht gebundenes Dexamethason durch eine Absorption an Aktivkohle entfernt und die verbleibende Menge des an GR gebundenen Dexamethasons gemessen.

In weiteren Versuchen wurde die Relevanz des korrekten Domänen-Aufbaus von FKBP51 getestet. Es wurde bereits gezeigt, dass FKBP51 sowohl eine intakte TPR-Domäne als auch eine FK1-Domäne benötigt, um in den Heterokomplex integriert werden zu können (siehe auch Kapitel 1.2). Um die Inkorporation von FKBP51 in den Komplex zu beweisen, wurden daher auch FKBP51_K352A (FKBP51TPRmut) und FKBP52_K354A (FKBP52TPRmut) jeweils zu 1 μ M im Radioaktiv-Bindungsassay vermessen. Wie erwartet, hatte keines der Proteine einen Effekt auf die Bindung von Dexamethason an den GR. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass beide Proteine nicht in den Komplex integriert wurden und folglich auch nicht in der Lage waren, den GR zu modulieren.

4. Ergebnisse

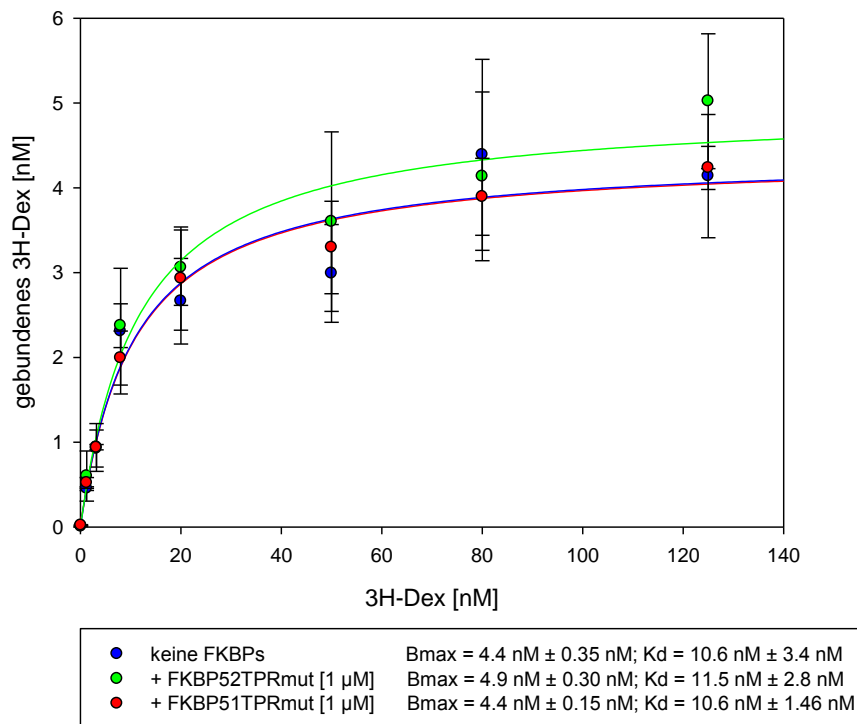


Abbildung 30: FKBP mit entsprechender TPR-Mutation haben keinen Effekt auf den GR. GR-überexprimierende HEK-Zelllysate wurden mit 1 µM humanem FKBP51TPRmut sowie FKBP52TPRmut inkubiert und mit unterschiedlichen Mengen radioaktiven Dexamethasons behandelt. Anschließend wurde nicht gebundenes Dexamethason durch eine Adsorption an Aktivkohle entfernt und die verbleibende Menge des an GR gebundenen Dexamethasons gemessen.

Im Fortgang der Untersuchungen galt es zu belegen, ob und wenn ja, inwieweit die FK1-Domäne von FKBP51 und die Assoziation des gesamten Proteins an den Rezeptorkomplex in diesem Assay relevant sind. Hierfür wurde die Bindung von 10 nM 3H-Dexamethason an den GR getestet. Erneut wurden daher FKBP51 sowie dessen aufgereinigte FK1-Domäne (FKBP51FK1-Domäne) wie auch FKBP51 mit delegierter FK1-Domäne (FKBP51deltaFK1) eingesetzt. Wie aus Abbildung 31 deutlich hervorgeht, beeinflusst lediglich die Vollängen-Version von FKBP51 die Ligandenbindungsaffinität von Dexamethason an der GR. Eine Deletion der FK1-Domäne hingegen führt zu einem Bindungsverhalten, das dem basalen Wert (Bindung ohne FKBP51) entspricht. Das alleinige Vorhandensein einer FK1-Domäne in der Lösung löst folglich keinen Effekt auf den GR aus. In Verbindung mit den eben zuvor gezeigten Daten (Abbildung 30) lässt sich demnach festhalten, dass FKBP51 sowohl eine intakte FK1-Domäne aufweisen, gleichzeitig aber auch in der Lage sein muss, über dessen TPR-Domäne an Hsp90 zu binden, um in den Komplex integriert werden und letztendlich seine inhibitorische Wirkung auf den Rezeptorkomplex voll entfalten zu können.

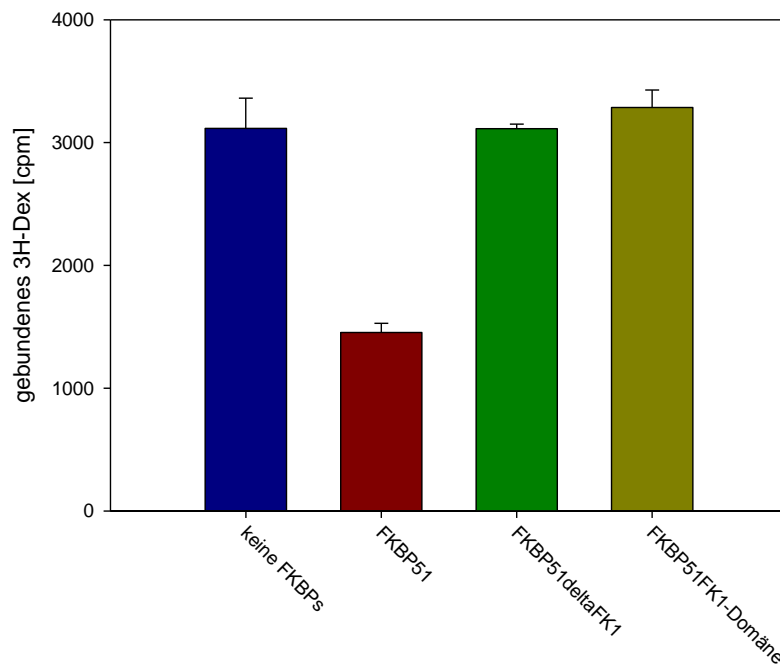
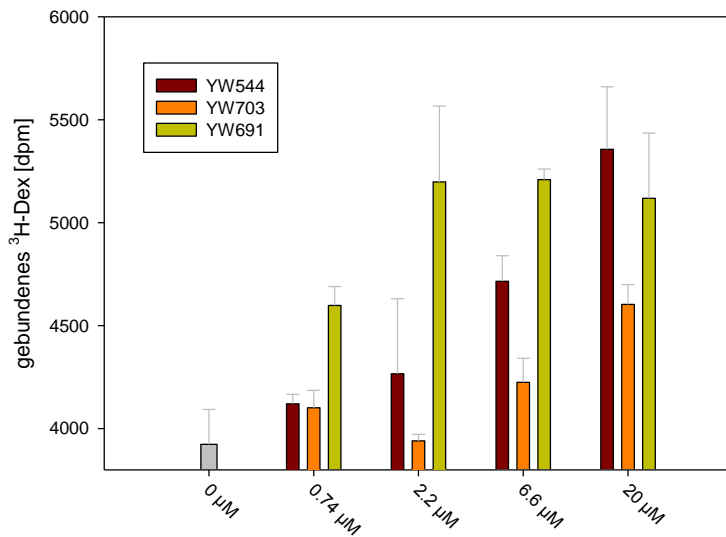


Abbildung 31: Effekte von FKBP51, FKBP51deltaFK1 und der FKBP51FK1-Domäne auf den GR. GR überexprimierende HEK-Zelllysate wurden mit 1 μ M humanem FKBP51, FKBP51deltaFK1 oder einer FKBP51FK1-Domäne inkubiert und mit 10 nM radioaktiven Dexamethasons behandelt. Anschließend wurde nicht gebundenes Dexamethason durch eine Adsorption an Aktivkohle entfernt und die verbleibende Menge an GR gebundenen Dexamethasons gemessen.

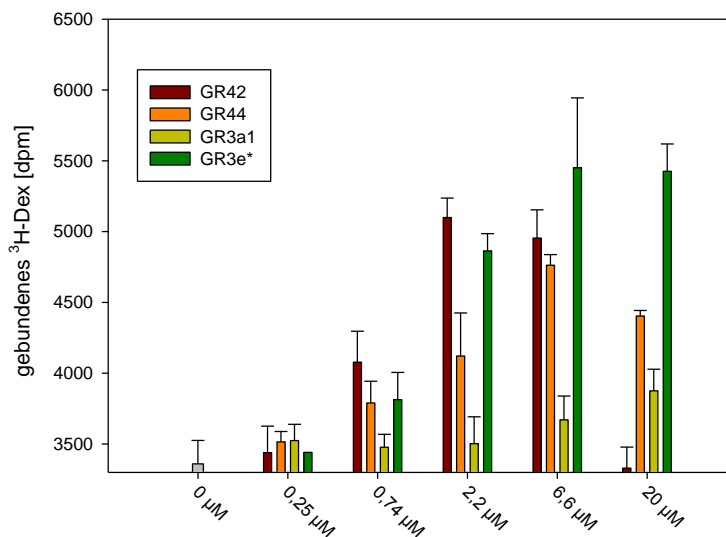
Nachdem nun belegt war, dass mit Hilfe des Radioaktiv-Bindungsassays sowohl die von FKBP51 ausgelösten inhibitorischen Effekte auf den GR als auch die Notwendigkeit relevanter Domänen *in-vitro* nachgewiesen werden konnten, gingen wir der Frage nach, ob Inhibitoren, die an die FK1-Domäne von FKBP51 binden, ebenfalls einen modulatorischen Effekt auf die von FKBP51 ausgelöste Inhibition der Ligandenbindung, und somit auf Steroid-Signalwege, entfalten. Hierfür wurden Liganden synthetisiert [156, 157], die sich vor allem in ihren Bindungskonstanten gegenüber FKBP51 unterschieden (siehe Tabelle 16 und Tabelle 18). Alle Liganden wurden in unterschiedlichen Konzentrationen im Radioaktiv-Bindungsassay getestet (Abbildung 32). Das Ergebnis: Die getesteten Liganden waren nicht nur in der Lage, die durch FKBP51 ausgelöste Inhibition durch Bindung an die FK1-Domäne zu blockieren, dieser Vorgang verlief außerdem in direkter Korrelation zu den entsprechenden Bindungsaffinitäten (YW691 > YW544 > YW703 und GR42 > GR3e*/GR44 > GR3a1). Somit konnten wir erstmals beweisen, dass durch selektive Inhibition von FKBP51 ein direkter Einfluss auf die Ligandenbindungsaffinität und dadurch auf die Signaltransduktion von Steroidhormonrezeptoren möglich wird.

4. Ergebnisse



Ligand	FKBP51
YW544	7,566 ± 0,508
YW703	13,851 ± 0,868
YW691	0,294 ± 0,243

Tabelle 16: Bindungsaffinitäten (K_i in μM) gegenüber FKBP51. Die aufgereinigten FK1-Domänen des Wildtyp-Proteins FKBP51 (4,5 nM) werden durch Titrieren der Liganden gegen den Tracer CK97 (3 nM) durch Fluoreszenz-Polarisation gemessen [179].



Ligand	FKBP51
GR42	0,456 ± 0,05
GR44	2,03 ± 0,09
GR3a1	4,29 ± 0,19
GR3e*	2,02 ± 0,14

Tabelle 17: Bindungsaffinitäten (K_i in μM) gegenüber FKBP51. Die aufgereinigten FK1-Domänen des Wildtyp-Proteins FKBP51 (4,5 nM) werden durch Titrieren der Liganden gegen den Tracer CK97 (3 nM) durch Fluoreszenz-Polarisation gemessen [156, 157].

Abbildung 32: Blockade der durch FKBP51 ausgelösten Inhibition der Bindungsaffinität von Dexamethason an den GR. GR-überexprimierende HEK-Zellysate wurden mit 100 nM FKBP51, 10 nM radioaktiven Dexamethasons und unterschiedlichen Konzentrationen an FKBP51-Inhibitoren behandelt. Anschließend wurde nicht gebundenes Dexamethason durch eine Absorption an Aktivkohle entfernt und die verbleibende Menge des an GR gebundenen Dexamethasons gemessen.

4.6 Der Einfluss von Immunophilin-Liganden auf das Differenzierungsverhalten von N2a-Zellen

Bereits 1987 beschrieben Kino et al. die Entdeckung des für die Gruppe der FKBP's namensgebenden Liganden, nämlich FK506 [180]. Damals konnte neben weiteren wichtigen chemischen und biologischen Funktionen besagter Verbindung auch deren immunsuppressiver Effekt aufgedeckt werden. Es zeigte sich, dass das neu entdeckte FK506 in seiner immunsuppressiven Wirkung 100 mal potenter war als das ihm verwandte Cyclosporin A. Schon bald erlangten FK506 sowie Rapamycin (ebenfalls ein Ligand der FKBP's) daher eine zentrale Bedeutung in der klinischen Anwendung. Beide Verbindungen kommen dort vor allem als Immunsuppressivum nach Organtransplantationen zum Einsatz. Zwischenzeitlich hat sich das Anwendungsgebiet der Liganden allerdings noch weiter vergrößert. So zeigten sie neben Lebenszeitverlängernden Effekten bei Mäusen [181] besonders im Bereich der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Chorea Huntington, Alzheimer oder Parkinson großes Potenzial [67, 182, 183]. In diesem Zusammenhang wurden den Liganden vor allem neuron-protective Eigenschaften zugesprochen. Gold et al. zeigten in einem Mausmodell, dass durch subkutane Injektion von FK506 die Regenerierung von beschädigten Axonen nicht nur beschleunigt wurde, sondern dass diese sich nach einer Neubildung auch morphologisch in Durchmesser und Länge deutlich von kontroll-behandelten Neuronen unterschieden [184].

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits Abhängigkeiten unterschiedlicher FKBP's im Bezug auf das Verhalten von differenzierenden N2a-Zellen nachgewiesen werden konnten, stellten wir uns in einem nächsten Schritt die Frage, ob in unserem Modell FKBP-Liganden auch durch Inhibition von endogen exprimierten Wildtyp-FKBP's Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zellen zu nehmen vermögen. Wir testeten daher zunächst die beiden prominentesten Vertreter ihrer Art, nämlich FK506 und Rapamycin. Beide wirken immunsuppressiv, wobei sie sich nach erfolgreicher Bindung an ihr Zielprotein allein in der Formierung ternärer Komplexe unterscheiden. Während FK506 die Phosphatase Calcineurin rekrutiert, induziert Rapamycin ternäre Komplexe mit der Kinase mTOR. So wurde ein Neuriten-Wachstums-Assay durchgeführt, im Rahmen dessen Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an FK506 oder Rapamycin behandelt wurden. Wie in Abbildung 33 ersichtlich, wird der Neuritenwuchs durch FK506 zunächst dosisabhängig begünstigt. Hierbei steigt die gemessene Durchschnittslänge bis zu einer effektiven Konzentration von 100 nM im Medium an. Der Vergleich mit jenen Zellen, die zuvor mit Aldosteron behandelt wurden, führt jedoch vor Augen, dass dieser Effekt weit weniger stark ausfällt, als der durch steroidale Behandlung. Erhöht man die Konzentration des Liganden weiter, ändert sich das Differenzierungsverhalten der N2a-

4. Ergebnisse

Zellen: Die durchschnittlichen Gesamtneuritenlängen der Zellen gehen bis auf Ausgangsniveau zurück. Anders als in immunsuppressiven Reaktionen weist Rapamycin in diesem Modell kein FK506-ähnliches Verhalten auf. Es unterstützt den Differenzierungsstatus nicht und führt ab einer Konzentrationen von 30 nM zu einer starken Inhibition der Neuritogenese. Dies lässt auf einen Effekt vermittelt durch die Inhibition von mTOR schließen.

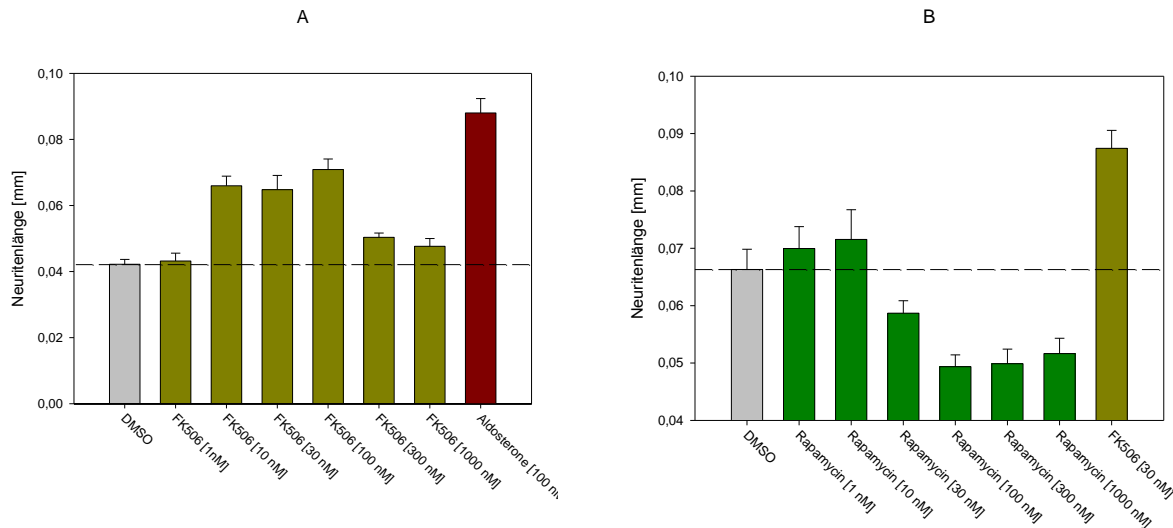


Abbildung 33: Der Immunophilin-Ligand FK506 (A) verstärkt das Neuritenwachstum von N2a-Zellen während Rapamycin (B) gegenteilige Effekte zeigt. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive FK506 oder Rapamycin in entsprechender Konzentration, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

Neben den immunsuppressiven Liganden der Immunophiline, wie FK506 und Rapamycin, sind auch solche Liganden bekannt, die keine immunsuppressive Wirkung aufweisen. Um zu überprüfen, ob die wachstumsmodulatorischen Eigenschaften von FK506 auf dessen immunsuppressiver Wirkung beruhen, wurde daher der gleiche Test mit den Verbindungen FK1706 und Antascomycin wiederholt (Abbildung 34). Bei ihnen handelt es sich um Moleküle, die chemisch FK506 ähneln und ähnlich gut an FKBP's binden. Deren Effektor-Domänen ist jedoch so modifiziert, dass sie keine Inhibition von Calcineurin oder mTOR mehr ausüben können. Nach anfänglicher Steigerung des Differenzierungsverhaltens der Zellen bis zu einer effektiven Konzentration von 30 nM (Antascomycin) beziehungsweise 100 nM (FK1706), nimmt dieses bei konstanter Konzentrationserhöhung wieder ab. Da sowohl bei immunsuppressiven wie auch nicht-immunsuppressiven Liganden ein Einfluss auf die Differenzierung der N2a-Zellen deutlich zu erkennen ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Modulation des Neuritenwachstums nicht auf einer Inhibition von Calcineurin beruht. Alle Immunophilin-Liganden zeigen zunächst einen vielversprechenden Effekt auf die Differenzierung von Neuroblastoma-Zellen. Diese Tatsache wird

4. Ergebnisse

jedoch durch den sich anschließenden abfallenden Trend der Neuritlängen bis auf Basalniveau wieder in Frage gestellt. Ein klinischer Einsatz solcher Verbindungen und der damit benötigten exakten Plasmaspiegel wäre bei einem derartigen Wirkungsprofil wohl nur sehr eingeschränkt beziehungsweise gar nicht möglich.

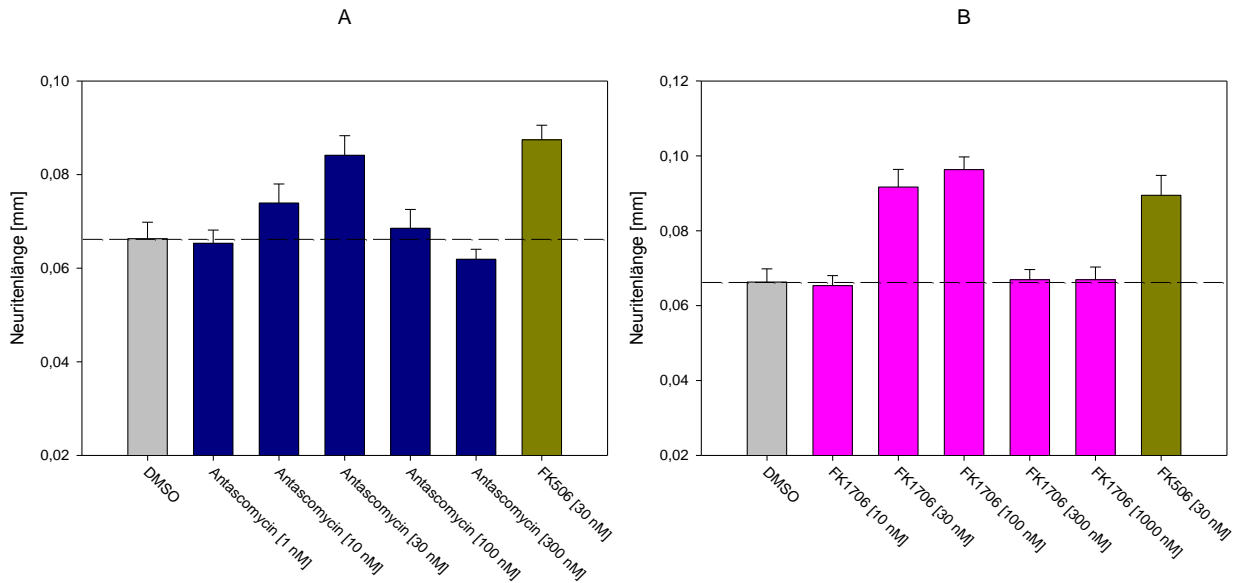


Abbildung 34: Die nicht-immunsuppressiven Liganden Antascomycin (A) sowie FK1706 (B) verstärken das Neuritenwachstum von N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive Antascomycin oder FK1706 in entsprechender Konzentration, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

4.7 Die Stimulation des Wachstumsverhaltens von N2a-Zellen durch FKBP51 selektive Liganden

Nachdem nunmehr belegt werden konnte, dass die durch FKBP51 und FKBP52 ausgelösten antagonistischen Effekte bezogen auf das Differenzierungsverhalten pharmakologisch kontrollierbar sind (siehe Kapitel 4.3) und die Erkenntnis gewonnen wurde, dass die in Abschnitt 4.6 aufgeführten, unselektiven Liganden in diesem Zusammenhang aller Wahrscheinlichkeit nach keinen zufriedenstellenden Einsatz ermöglichen drängte sich die Frage auf, ob es möglich ist, endogenes FKBP51 selektiv zu inhibieren, um dadurch die durch FKBP51 ausgelösten – gegebenenfalls pathologischen – Effekte zu blockieren. Liganden für Immunophiline wurden bereits mehrfach im Zusammenhang mit neuroregenerativen beziehungsweise neurotrophen Eigenschaften beschrieben. Jedoch konnte bisher nicht exakt geklärt werden, welche Mitglieder der Familie der FKBP5 für welche Effekte verantwortlich sind. Ein Grund hierfür war bislang das Nichtvorhandensein selektiver Liganden dieser Proteine. Um dieses Problem zu lösen, wurde in der AG Hausch eine dem FK506 verwandte Verbindung synthetisiert, die selektiv an FKBP51, nicht jedoch an FKBP52 zu binden vermag [91]. Die Affinitäten dieser Substanzen für FKBP51 und FKBP52 sind in Tabelle 18 aufgeführt. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Gegensatz zu FK506 und Rapamycin SG568 eine weit über 1000-fache Selektivität zu FKBP51 gegenüber FKBP52 aufweist. Anschließend wurde ein Neuritenwachstums-Assay umgesetzt, in dem unterschiedliche Konzentrationen beider selektiver Liganden getestet wurden. Wie Abbildung 35 zu entnehmen ist, sind beide Verbindungen in der Lage, die Differenzierung der Neuro-2a-Zellen signifikant und dosisabhängig zu steigern. Dabei erreichen die Längen der Neuriten ihr Maximum bei Konzentrationen zwischen 10 und 30 nM und fallen anschließend ein wenig ab. Interessanterweise gehen diese aber nicht wie bei der Verwendung von FK506 auf das Basalniveau zurück (vergleiche auch Abbildung 33), sondern nähern sich auch bei höheren Konzentrationen einem Plateau um die 0,07 mm an.

4. Ergebnisse

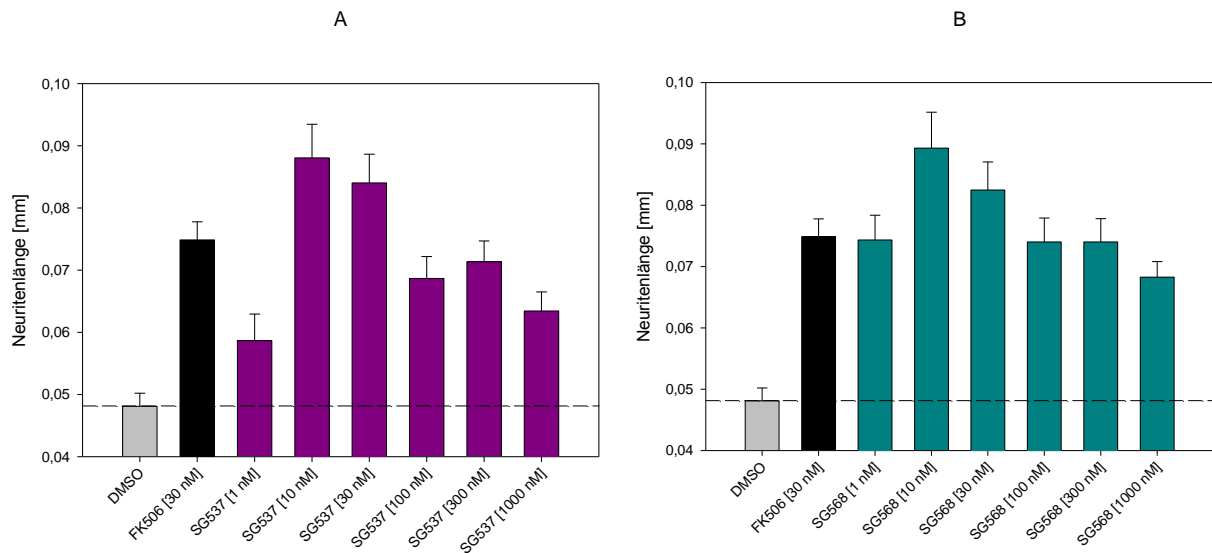


Abbildung 35: SG537 und SG568 verstärken das Neuritenwachstum von N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive SG537 oder SG568 in entsprechender Konzentration, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

Ligand	FKBP51 wt	FKBP52 wt
FK506	93 ± 19	225 ± 66
Rapamycin	6 ± 1	52 ± 33
SG537	6 ± 2	>50000
SG568	4 ± 0,3	>30000

Tabelle 18: Bindungsaffinitäten (K_i in nM) von FK506 und Rapamycin sowie SG568 an FKBP51 und FKBP52. Die aufgereinigten FK1-Domänen der Wildtyp-Proteine FKBP51 (4,5 nM) sowie FKBP52 (400 nM) werden durch Titrieren der Liganden gegen den Tracer CK97 (3 nM) durch Fluoreszenz-Polarisation gemessen [91].

Im nächsten Schritt führten wir einen Neuriten-Wachstums-Assay durch, in dem wir direkt die von FK506 hervorgerufenen Effekte mit denen von SG568 verglichen (Abbildung 36). Zu Beginn der Titration verhält sich SG568 ähnlich wie FK506. Im unteren nanomolaren Bereich führte es zu einem verstärkten Differenzierungsverhalten der N2a-Zellen. Hierbei ist bemerkenswert, dass der Effekt schon ab einer Konzentration von 1 nM evident wird, während der von FK506 erst in einem Bereich von 10 – 100 nM auftritt. Weiter sind die gemessenen Absolutlängen der mit SG568 behandelten Zellen um bis zu 40 Prozent länger als die der mit FK506 versetzten. Des Weiteren ist zu beobachten, dass, verglichen mit unselektiven Liganden, die gemessenen Neuritenlängen erneut bei einer Konzentration um 10 nM in ihrem Wachstum gipfeln und dann wieder leicht abfallen, sie hierbei jedoch nicht auf das Ausgangsniveau zurückkehren, sondern sich konstant auf dem bei

bereits 1 nM erreichten Differenzierungsmuster einpendeln. Somit könnte das bereits beschriebene Problem des konstanten Plasmaspiegels hier außer Acht gelassen werden, da selektive Liganden scheinbar über einen größeren Bereich hinweg ihre neurotrophen Effekte aufrechterhalten können.

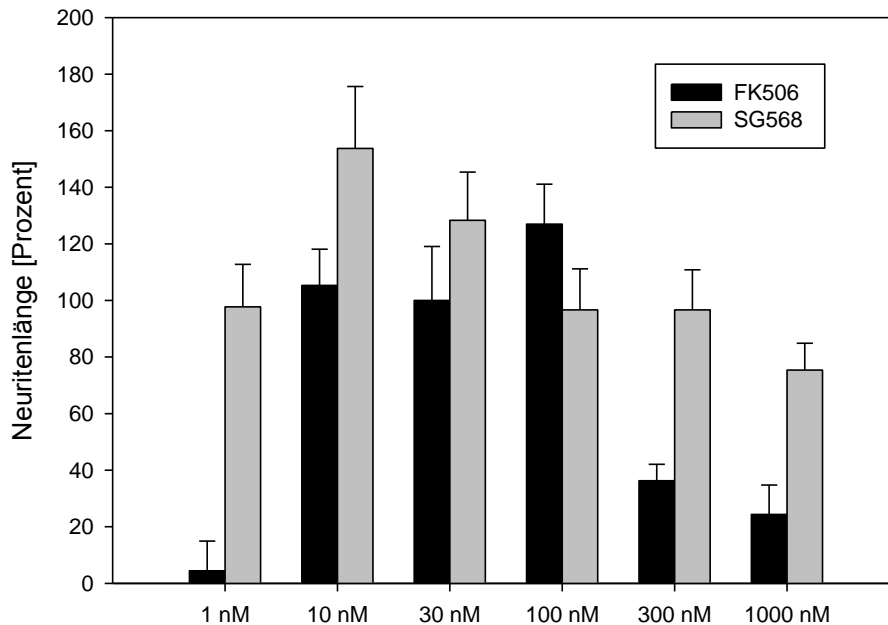


Abbildung 36: SG568 verstärkt das Neuritenwachstum von N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive SG568 oder FK506 in entsprechender Konzentration, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar. Die Stimulation durch 30 nM FK506 wurde als 100 % definiert.

Um ausschließen zu können, dass der Inhibierung von FKBP12 in diesem Mechanismus eine Funktion zukommt, führten wir zusätzlich Neuriten-Wachstums-Assays mit dem schon weiter oben beschriebenen Inhibitor GR44 durch. Dieser bindet in den verwendeten Konzentrationen nicht an FKBP51 (IC_{50} : $2,03 \mu\text{M} \pm 0,09$), jedoch sehr potent an FKBP12 (IC_{50} : $0,003 \mu\text{M} \pm 0,0005$) [156]. Zusätzlich untersuchten wir die Effekte von N-(N',N'-dimethylcarboxamidomethyl)cycloheximid (DMCH), einem FKBP38-Inhibitor [68]. Wie in Abbildung 37 deutlich zu erkennen ist, bewirken weder GR44 noch DMCH eine Änderung des Differenzierungsverhaltens der Neuroblastoma-Zellen. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass weder FKBP12 noch FKBP38 in dem Entwicklungsprozess der N2a-Zellen von Bedeutung sind. Somit scheint die selektive Inhibition von FKBP51 (nicht jedoch von FKBP12, FKBP38 oder FKBP52) in diesem Zusammenhang von äußerster Wichtigkeit zu sein und eine zentrale Stellung von FKBP51 in neurodegenerativen Erkrankungen anzudeuten.

4. Ergebnisse

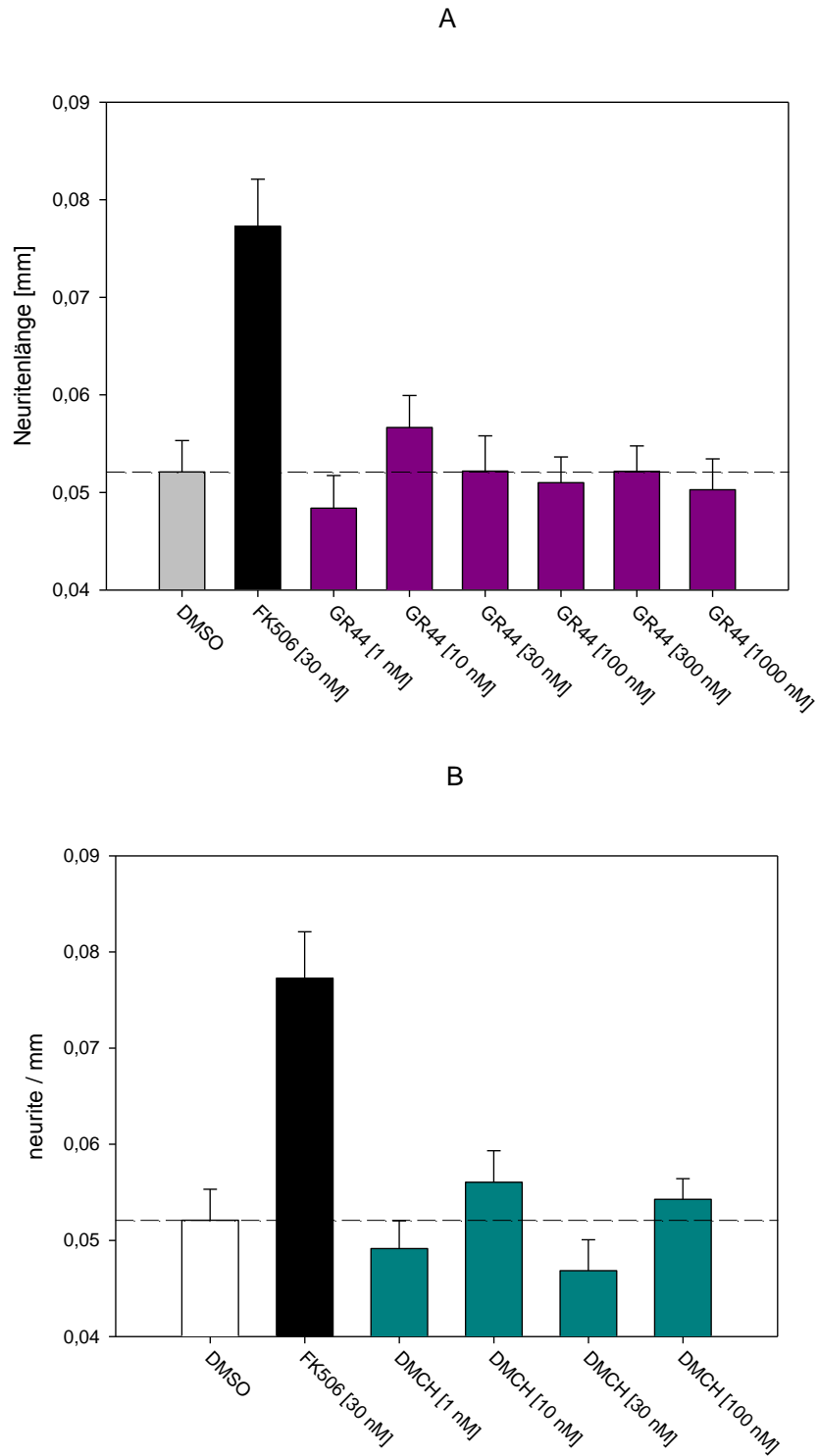


Abbildung 37: GR44 und DMCH haben keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum von N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive GR44 oder DMCH in entsprechender Konzentration, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

4.8 Mechanistische Studien zur Stimulation des Neuritenwachstums von N2a-Zellen durch Steroide

Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, haben sowohl Agonisten des MRs als auch des GRs einen stimulierenden Effekt auf das Differenzierungsverhalten von N2a-Zellen. In beiden Fällen stieß dieser Effekt allerdings bei einer Konzentration von 100 nM an seine Grenzen. Wurde die Konzentration von Aldosteron oder Ru26988 im Medium nun sukzessive weiter erhöht, so reduzierten sich die Absolutlängen wieder, bis sie letztendlich ihr Ausgangsniveau erreichten. Wie konnte es zu solch einem Effekt kommen? Es wurde bereits gezeigt, dass FKBP51 als regulatorisches Protein für nukleäre Steroidhormonrezeptoren auftreten kann, dessen Expression aber gleichzeitig unter Kontrolle der Selbigen steht [172]. Folglich liegt die Vermutung nahe, dass FKBP51 nicht nur die Ursache für ein vermindertes Differenzierungsverhalten der Neuroblastoma-Zellen ist, sondern dass es über dies durch die starke Stimulation des GRs beziehungsweise MRs induziert wird und es somit im Rahmen eines negativen Rückkopplungsmechanismus zu einer Inhibition der Steroidhormonrezeptoren führt und dadurch ebenfalls die Differenzierung der Zellen negativ beeinflusst.

Um diese These pharmakologisch zu prüfen, nutzten wir die Möglichkeit der selektiven Inhibition von endogenem FKBP51 durch Liganden SG568. Abermals induzierten wir die Differenzierung der N2a-Zellen mit Hilfe von Aldosteron, wobei wir das Medium jedoch zusätzlich mit DMSO oder 10 nM des Liganden SG568 versetzten. Dies entsprach der Konzentration mit dem stärksten stimulierenden Effekt aus Abbildung 36. Wie in Abbildung 38 zu sehen, konnte durch unterschiedliche Dosen von Aldosteron zunächst eine verstärkte Differenzierung der N2a-Zellen herbeigeführt werden, welche ab 100 nM wieder abfiel. Durch Gabe von 1 μ M des Steroids gingen die Gesamtlängen der Neuriten wieder auf Basalniveau zurück. Dieser Rückgang jedoch konnte durch den Einsatz von SG568 unterbunden werden. Zu Beginn der Titration verhielten sich die Differenzierungsmuster der mit DMSO behandelten Zellen genauso wie die der mit SG568 behandelten Zellen. Beide erreichten ihre Maximallängen bei 100 nM Aldosteron im Medium. Wurde die Konzentration des Steroids jedoch weiter erhöht, so gingen die Gesamtlängen lediglich im Falle der DMSO-Behandlung wieder auf Ausgangsniveau zurück. Jene Zellen, die zusätzlich mit 10 nM des Liganden SG568 behandelt wurden, waren in der Lage, längere Neuriten zu bilden. Ein Tausch des spezifischen Liganden SG568 gegen die potenteste Konzentration (30 nM) an FK506, verursachte hier keinen Rettungseffekt (Abbildung 40). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es im Falle der mit behandelten Zellen zu einer selektiven Inhibition des verstärkt exprimierten FKBP51 kommt, das im Umkehrschluss nicht mehr in der Lage ist, die Differenzierung der N2a-Zellen negativ zu

beeinflussen. Dem unselektiven Liganden FK506 hingegen fehlt die Fähigkeit, Einfluss auf das Differenzierungsverhalten nehmen zu können. Grund hierfür könnte die unselektive Blockade mehrerer FKBP's durch FK506 sein. Diese Vermutung wurde im Rahmen eines ähnlichen Experiments mit dem GR-Agonisten Ru26988 bestätigt (vergleiche hierzu Abbildung 39). Auch hier konnte SG568 dem Rückgang der Neuritogenese, der durch das hoch konzentrierte Steroid ausgelöst wurde, entgegenwirken. Die Tatsache, dass FK506 keinen Rettungseffekt aufweist, deutet darauf hin, dass die Inhibition des Neuritenwachstumsverhaltens durch FKBP51 allein durch eine selektive Inhibition, nicht jedoch durch eine Inhibition von FKBP51 und FKBP52 gleichzeitig aufgehoben werden kann.

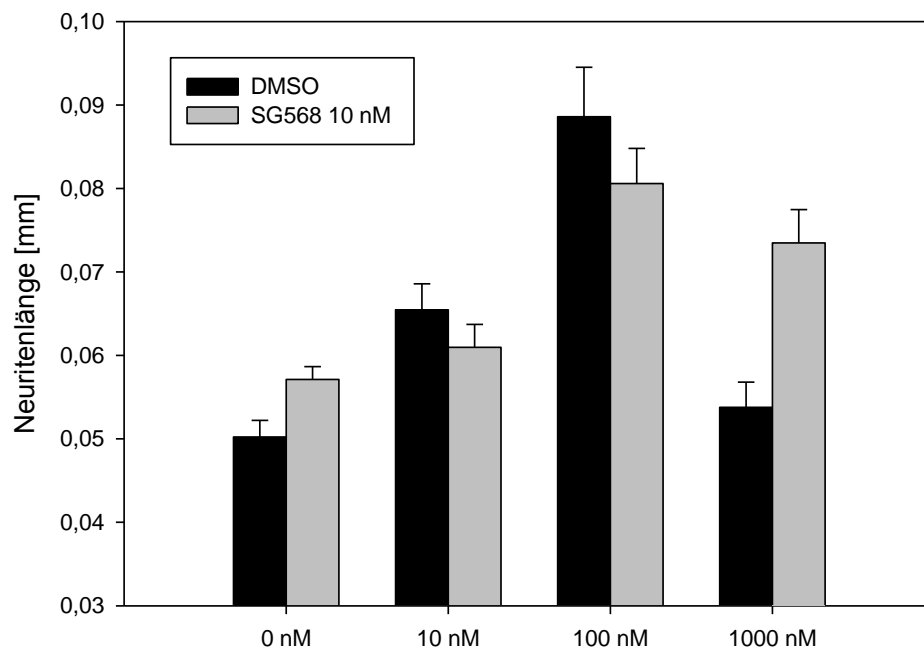


Abbildung 38: SG568 blockiert den Rückgang des Neuritenwachstums von N2a-Zellen bei 1 μ M Aldosteron. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive Aldosteron in entsprechender Konzentration und DMSO beziehungsweise 10 nM SG568, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

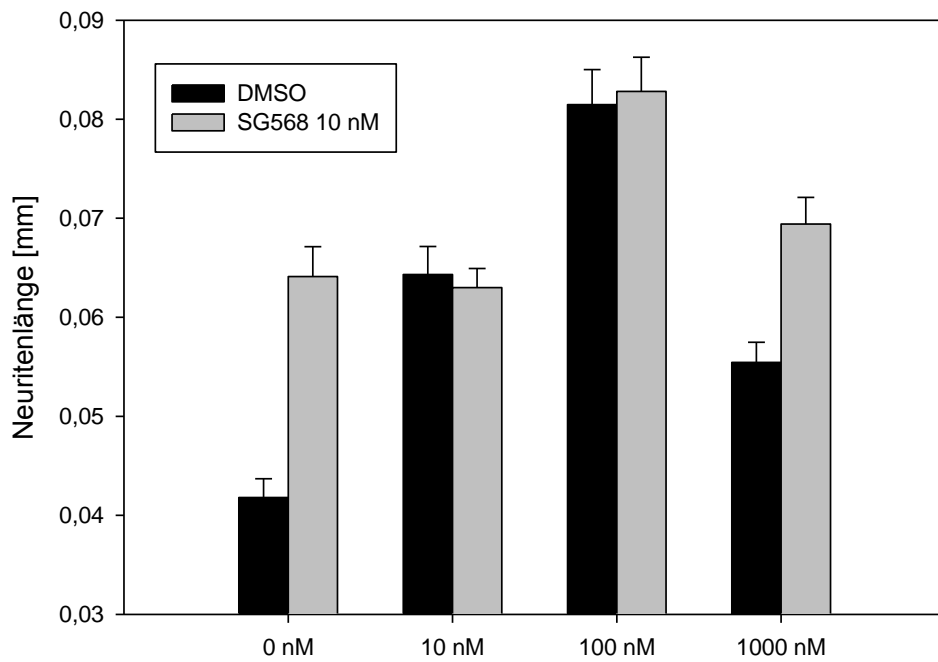


Abbildung 39: SG568 blockiert den Rückgang des Neuritenwachstums von N2a-Zellen bei 1 μM Ru26988. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive Ru26988 in entsprechender Konzentration und DMSO beziehungsweise 10 nM SG568, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

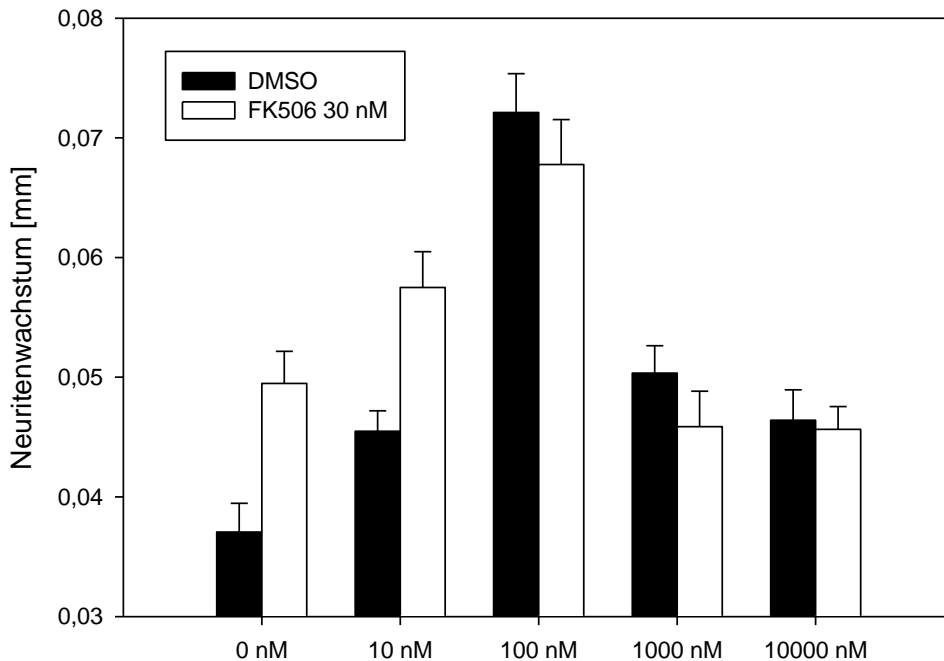


Abbildung 40: FK506 bewirkt keinen rückgängigen Effekt auf das durch 1 μ M Aldosteron ausgelöste Neuritenwachstum von N2a-Zellen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive Aldosteron in entsprechender Konzentration und DMSO beziehungsweise 30 nM FK506, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

Um die entwickelte Hypothese weiter validieren zu können, unterzogen wir sie in einer leicht veränderten Variation der soeben beschriebenen Versuche (Abbildung 38 und Abbildung 40) einer erneuten Überprüfung. Die N2a-Zellen wurden zu diesem Zweck mit einer hohen Steroid-Konzentration (1000 nM) behandelt, sodass sich die bereits entwickelten Neuriten auf basales Niveau reduzierten. Gleichzeitig wurde SG568 hinzutitriert, um dosisabhängig endogenes FKBP51 inhibieren zu können. Um die Arbeitshypothese sowohl für den MR als auch in Bezug auf den GR zu überprüfen, kamen im Rahmen dieser Experimente die Steroide Aldosteron sowie Ru26988 zum Einsatz. Als Positiv-Kontrollen dienten zum einen die jeweils effektivsten Konzentrationen der Steroide (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23) wie auch die des Liganden SG568 (Abbildung 36). Wie aus Abbildung 41 hervorgeht, ist unter Einsatz des Liganden SG568 ein dosisabhängiger Rückgang bis hin zur vollständigen Aufhebung der durch 1 μ M Ru26988 wie auch Aldosteron ausgelösten Reduktion des Neuritenwuchses auf Ausgangsniveau feststellbar. Dabei erhöhten sich die Absolutlängen sukzessive wieder auf ein Niveau, welches dem maximal Induzierbaren entspricht. Entsprechend liegt die Vermutung nahe, dass die unter steroidaler Kontrolle induzierte Expression

4. Ergebnisse

von FKBP51 durch höhere Konzentrationen der jeweiligen Steroide gesteigert wird. Erhöhte Quantitäten an translatiertem FKBP51 führen nachfolgend zu reduzierten Neuritenlängen, die durch die Gabe des selektiven Inhibitors wieder aufgefangen werden können. Im Gegensatz hierzu lassen unselektive Immunophili-Liganden, wie FK506, diese Wirkung vermissen. Sie sind nicht in der Lage, die durch erhöhte Steroid-Spiegel ausgelöste Blockade der Neuriten zu inhibieren, also neurotroph zu wirken.

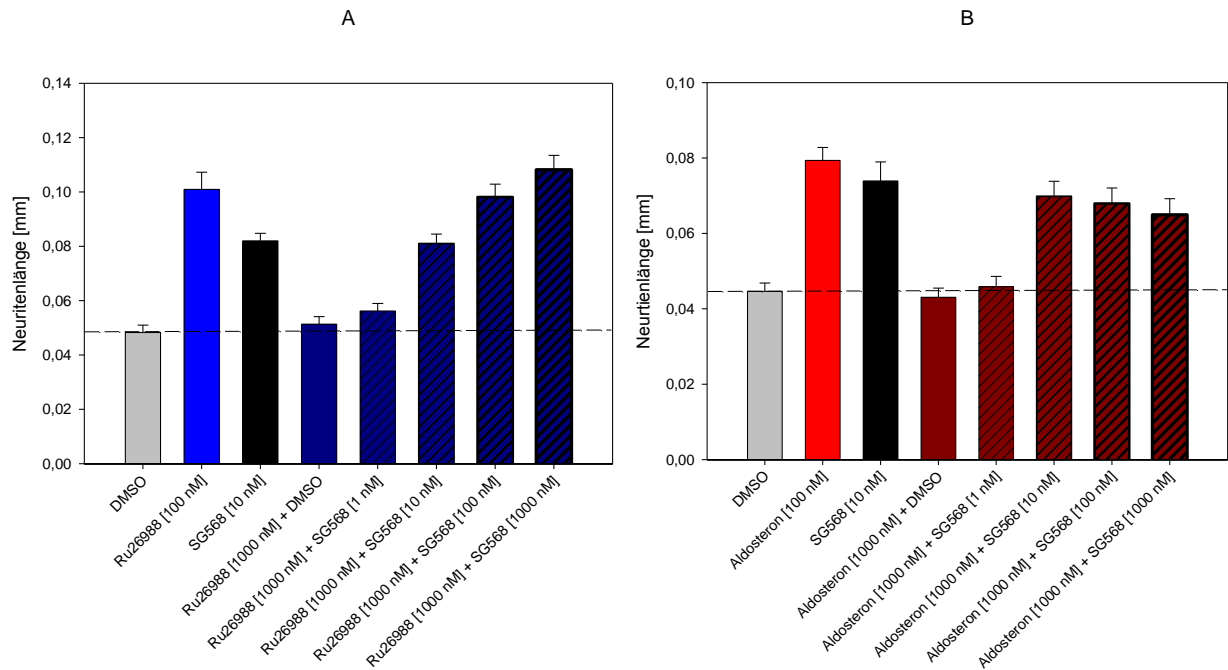


Abbildung 41: SG568 wirkt dem Rückgang des Neuritenwachstum ausgelöst durch 1 μ M Ru26988 (A) beziehungsweise Aldosteron (B) dosisabhängig entgegen. N2a-Zellen wurden jeweils mit 80 ng myr-Venus sowie 720 ng pRK5-Leervektor transfiziert. Während der Transfektion wurde das Medium gegen FCS-freies Medium, inklusive Ru26988 oder Aldosteron in entsprechender Konzentration und DMSO beziehungsweise SG568, getauscht und damit die Differenzierung der N2a-Zellen für 36h ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Pro Bedingung wurden 25 bis 40 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

4.9 Der Einfluss von FKBP51 und Steroiden auf die Neuritogenese von hippocampalen primären Neuronen

Verschiedene Laboratorien zeigten bereits, dass Stress einen signifikanten Einfluss auf die hippocampale Neubildung von Neuronen in Tieren ausübt. Dabei konnte in Tiermodellen für Depressionen beobachtet werden, dass Stress zu einer Herabregulierung der Neurogenese führt. Weiter stellte man fest, dass durch Gabe von Antidepressiva diese wieder hochreguliert werden kann, was wiederum zu der Schlussfolgerung führte, dass sowohl die Neurogenese als auch andere Faktoren, welche die hippocampale Plastizität beeinflussen, eine wichtige Stellung im Verlauf von Depressionen und deren Behandlung einnehmen. Dies geht sogar so weit, dass einige Gruppen eine korrekte Neurogenese als Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung mit Antidepressiva ansehen [185] und konstatieren, dass der Effekt von Antidepressiva auf genau dieser Neurogenese beruht [186]. Verschiedenste Substanzen sind bereits auf ihre neurotrophe Wirkung hin untersucht und beschrieben worden. Hierbei steht vor allem deren therapeutischer Einsatz bei neurodegenerativen Erkrankungen im Vordergrund, der auf das Überleben von Neuronen sowie den Schutz vor Schäden durch Stressoren abzielt. Das Studium der Neuriten-Wachstums-Modulation als Marker für die Zelldifferenzierung gilt mittlerweile als Standard-Verfahren, um neurotrophe Eigenschaften von Medikamenten *in-vitro* besser untersuchen zu können [187]. Zahlreiche Substanzen sind bereits in Dosis-Wirkungs-Studien bezüglich ihrer Effekte auf die Neuritogenese untersucht worden. Leider fehlt hierbei meist noch die Darlegung plausibler Mechanismen, die den beobachteten Effekten zugrunde liegen. Es ist auffällig, dass die Dosis-Wirkungs-Beziehungen dieser neurotrophen Substanzen meist die Form einer Glockenkurve darstellen [188-190]. Bereits in den neunziger Jahren beschrieben verschiedene Forschungsgruppen die neurotrophe Wirkung von FK506 [64, 190, 191]. In weiteren Studien konnten Gold et al. zudem zeigen, dass andere Immunosuppressiva (Derivate des FK506), die keine immunsuppressive Wirkung mehr auslösen konnten, und gleichzeitig unfähig waren, an FKBP12 zu binden, ebenfalls das Wachstum von SH-SY5Y-Neuriten modulieren konnten. Auch diese wiesen in ihren Dosis-Wirkungs-Kurven ein glockenähnliches Verhalten auf [65].

Um zu überprüfen ob FKBP51 in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt, nutzten wir hippocampale E18 Neuronen aus C57Bl/6 Mäusen, um sowohl deren Neuriten-Bildung wie auch Vitalität näher zu untersuchen. Hierfür wurden Neuronen präpariert (siehe Kapitel 3.3.3) und mit Hilfe von Adeno-assoziierten Viren entweder nur mit eGFP, FKBP51 oder der Mutante FKBP51F67V transfiziert. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte durch die quantitative Auszählung der mit DAPI angefärbten Zellen an DIV3 sowie DIV10. Wie in Abbildung 42 deutlich zu erkennen ist, hat die

4. Ergebnisse

Expression von FKBP51 sowie FKBP51F67V keinerlei Einfluss auf die Gesamtzellzahlen nach drei Tagen. Die Gesamtzahl der transfizierten Zellen entspricht den eGFP-exprimierenden Kontrollen. Belässt man die Zellen jedoch weiter in Kultur, so ist eine Abnahme der Zellpopulation sowohl bei der Expression von FKBP51 als auch dessen Punktmutant feststellbar.

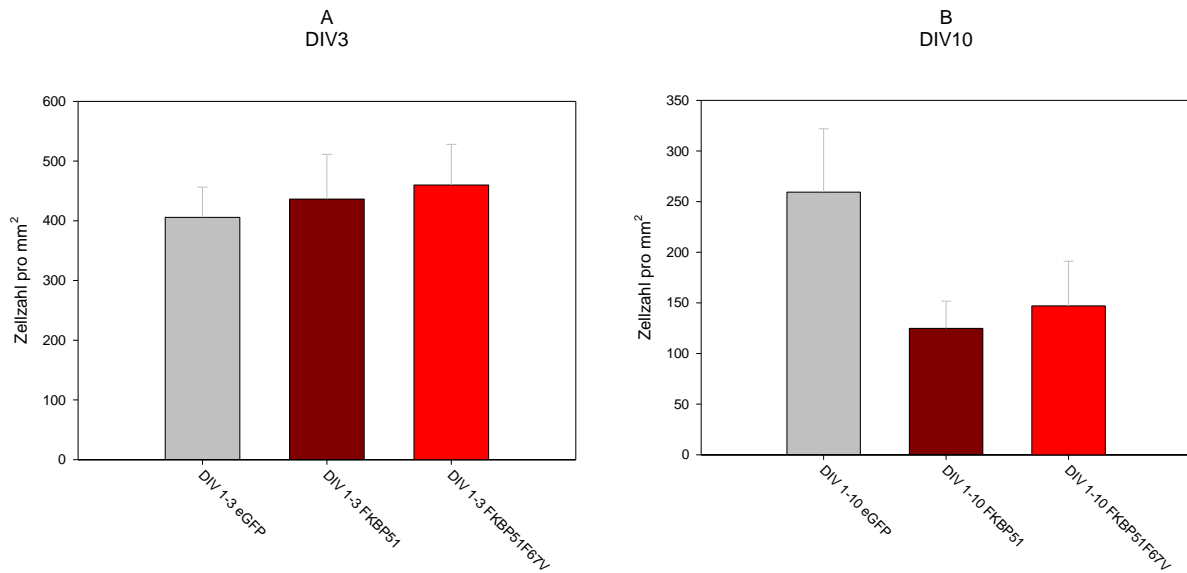


Abbildung 42: FKBP51 sowie FKBP51F67V bewirken eine Abnahme der Zellzahl von hippocampalen Neuronen nach 10 Tagen. Hippocampale E18 Neuronen wurden an DIV1 sowohl mit eGFP, FKBP51 oder FKBP51F67V-überexprimierenden Adenoassoziierten Viren transfiziert. Nach 3 (A) beziehungsweise 10 (B) Tagen wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert, mit DAPI gefärbt und die Zellzahlen durch Zählen von DAPI positiven bestimmt.

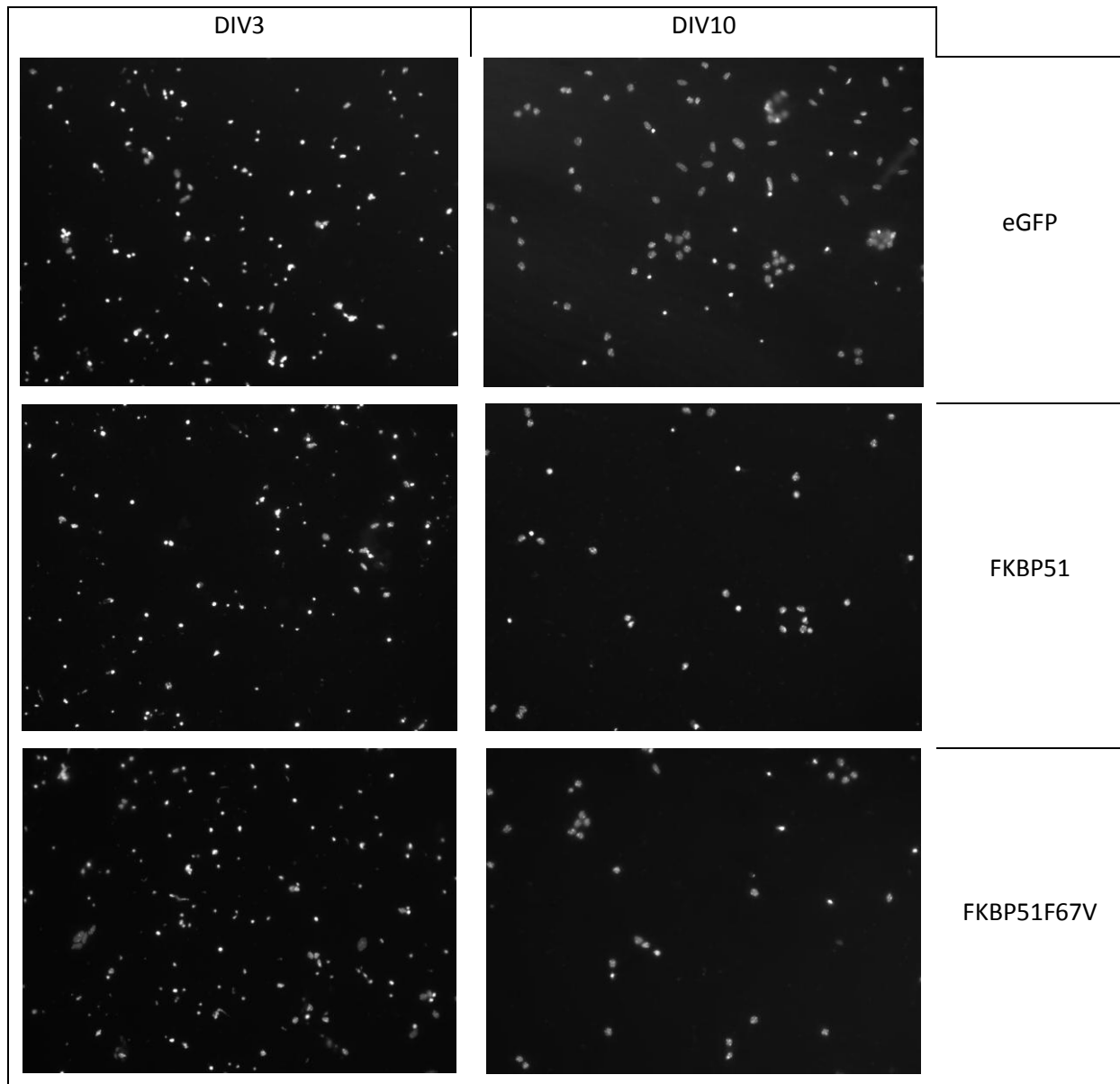


Abbildung 43: Beispielbilder der in Abbildung 42 dargestellten Abnahmen der Zellzahlen durch Transfektion von eGFP, FKBP51 oder FKBP51F67V. Hippocampale E18 Neuronen wurden an DIV1 sowohl mit eGFP, FKBP51 oder FKBP51F67V-überexprimierenden Adenoassoziierten Viren transfiziert. Nach 3 beziehungsweise 10 Tagen wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert, mit DAPI gefärbt und die Zellzahlen durch Zählen von DAPI positiven bestimmt. Die Bildausschnitte entsprechen einer Fläche von 0,37 mm² (20 fache Vergrößerung).

Neben der Zellzahl wurden zusätzlich die durchschnittlichen Neuritenlängen an DIV3 bestimmt (Abbildung 44). Hierbei sollte getestet werden, ob die in N2a-Zellen produzierten Daten sich auf ein primäres Zellsystem übertragen lassen und somit Aussagen über das Verhalten hippocampaler Neuronen möglich sind. Zu diesem Zweck wurden primäre Neuronen präpariert, die an DIV 1 entweder nur mit einem eGFP-Kontrollvirus, einem FKBP51- oder einem FKBP51F67V-überexprimierenden Virus transfiziert wurden. Zusätzlich wurden die Zellen vom Zeitpunkt der Transfektion an jeweils mit DMSO oder dem SG466 (1 µM) behandelt. Dieser Ligand ist, wie schon

weiter oben berichtet, ausschließlich in der Lage, an die genetisch manipulierte Version des FKBP51-Proteins zu binden. Somit ließen sich Effekte, welche durch die selektive Inhibition von FKBP51 hervorgerufen werden, direkt mit diesem Protein assoziieren. Um bessere Aussagen sowohl über die Entwicklung von Axonen als auch von Dendriten treffen zu können, wurden die Daten auf zwei verschiedene Arten ausgewertet. Zum einen wurden ausschließlich die Längen des sich entwickelnden Axons, welches als längster Neurit definiert wurde, an DIV3 bestimmt (Abbildung 44 A), zum anderen wurde die Summe aller sich entwickelnden Neuriten der einzelnen Zellen (Abbildung 44 B) erfasst. Bei näherer Betrachtung ergab sich im Folgenden, dass die Differenzierung der primären Neuronen durch FKBP51, wie auch seine F67V-Mutante, deutlich vermindert ist. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde ein ähnlicher Versuch durchgeführt und erneut die Auswirkung von SG466 auf FKBP51F67V überexprimierende Neuronen getestet. Die Neuronen wurden dieses Mal bereits am zweiten Tag der *in-vitro* Kultur fixiert und sämtliche Neuriten vermessen. Es konnte wiederholt ein Effekt des Proteins, verglichen mit dem Kontrollvirus, festgestellt werden, der wiederum durch Einsatz des selektiven Liganden SG466 aufgehoben wurde. Es kann also davon ausgegangen werden, dass FKBP51 nicht nur im Neuroblastoma-Zellsystem, sondern vielmehr auch in primären hippocampalen Neuronen einen inhibierenden Effekt auf die Ausbildung von Neuriten ausübt. Vergleicht man die Bildung von Axonen sowie aller Neuriten, wird evident, dass der durch FKBP51 hervorgerufene Effekt verkürzter Neuriten bei Betrachtung aller Neuriten durch die Gabe des Inhibitors wieder ausgeglichen werden kann. SG466 ist in der Lage, das durch FKBP51F67V inhibierte Wachstum der Neuriten signifikant zu erhöhen, während der Effekt des Wildtyp-Proteins unangetastet bleibt. Somit konnten wir erstens zeigen, dass auch in einem primären Zellsystem das Protein FKBP51 und dessen Effekt auf den Auswuchs von Neuriten pharmakologisch inhibierbar sind. Weiter ist festzuhalten, dass dies vor allem einen Effekt auf die Entwicklung von Dendriten auszuüben scheint. Das inhibierte Verhalten der Axon-Entwicklung scheint durch den Einsatz von FKBP51-Inhibitoren weitestgehend unangetastet zu bleiben.

4. Ergebnisse

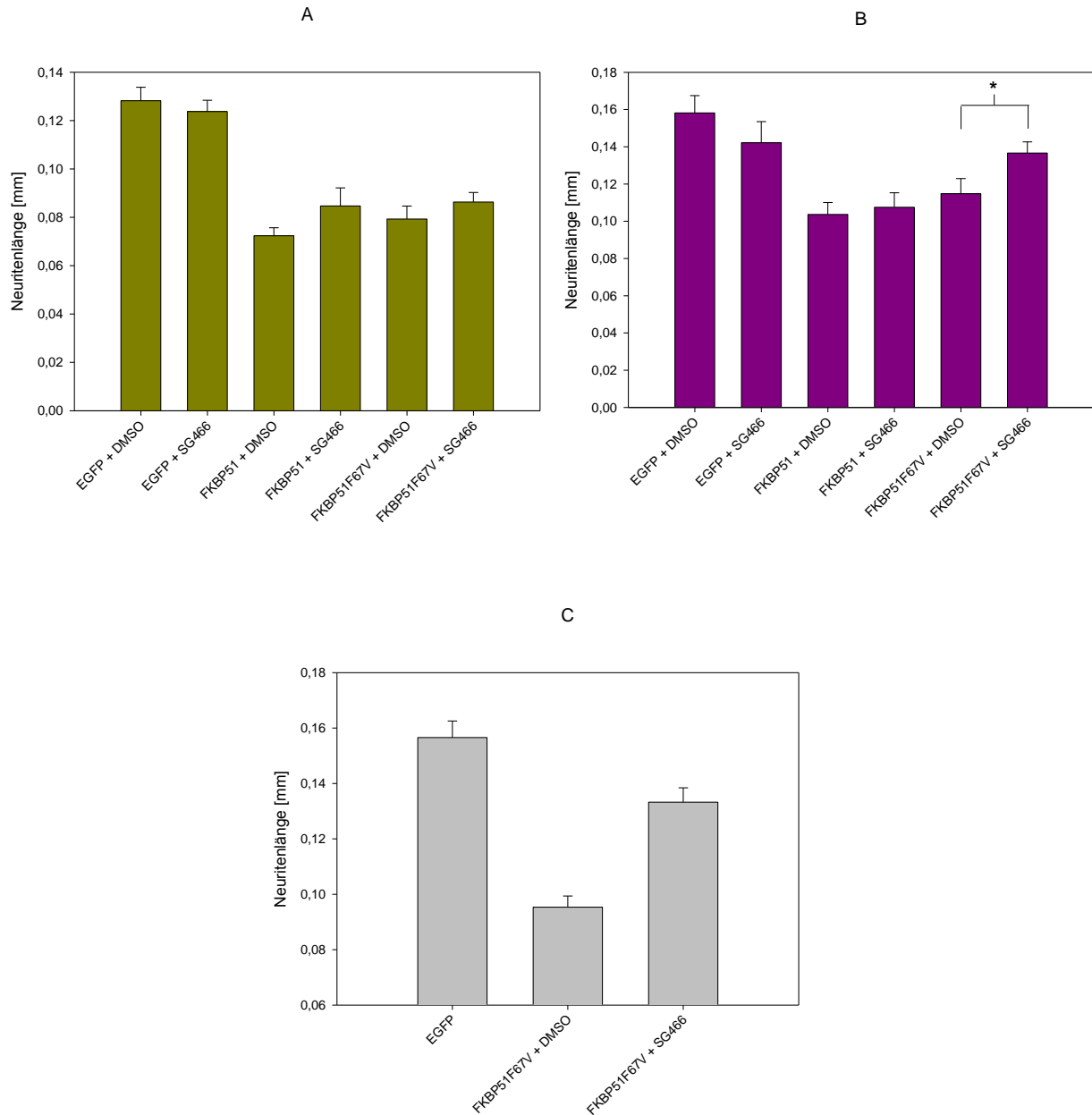


Abbildung 44: FKBP51 und FKBP51F67V inhibieren das Neuritenwachstum von hippocampalen E18 Neuronen. Hippocampale E18 Neuronen wurden an DIV1 (A und B) oder an DIV0 (C) sowohl mit eGFP, HA-FKBP51 oder HA-FKBP51F67V transfiziert wie auch mit DMSO beziehungsweise 1 μ M SG466 behandelt. An DIV3 (A und B) sowie an DIV2 (C) wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert, immunzytologisch entweder gegen eGFP oder die HA-Markierung gefärbt und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Es wurden entweder nur die Axone (A) oder sämtlich Neuriten der Zelle vermessen (B und C). Pro Bedingung wurden 35 bis 45 Zellen gezählt und der Mittelwert aller Neuriten pro Zelle ermittelt. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

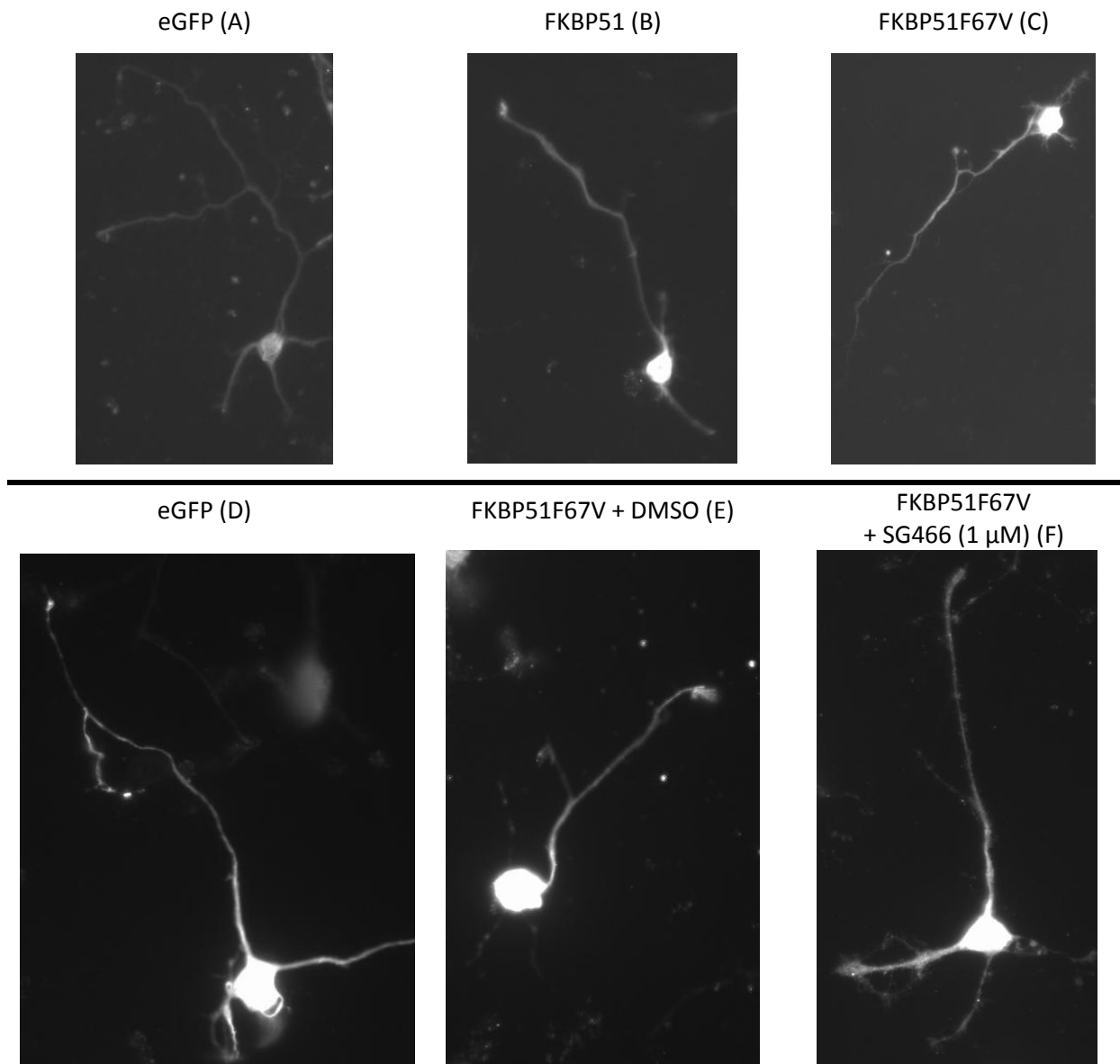


Abbildung 45: Beispielbilder der Inhibition des Neuritenwachstums von hippocampalen Neuronen durch FKBP51 wie auch FKBP51F67V und der Effekt von SG466. Neuronen des Hippocampus aus C57/Bl6 Mäuse-Embryonen wurden am 18. Tag der Embryonalentwicklung präpariert und jeweils an DIV1 (A-C) oder DIV0 (D-F) mit eGFP, HA-FKBP51 oder HA-FKBP51F67V transfiziert. Zusätzlich wurde entweder DMSO oder 1 µM SG466 dem Medium hinzugegeben. An DIV3 (A-C) oder DIV2 (D-F) wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert, immunzytologisch entweder gegen eGFP oder die HA-Markierung gefärbt und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Nachdem wir nun die Effekte von FKBP51 auf Neuroblastoma-Zellen in primären hippocampalen Neuronen reproduzieren konnten, stellten wir uns die Frage, ob die durch Steroide hervorgerufenen Effekte in Neuro-2a-Zellen auch in primären Neuronen nachgewiesen werden können. Hierfür wurden abermals Neuronen aus E18 C57Bl/6 Mäusen isoliert und mit steroidhaltigem Wachstumsmedium kultiviert. Am zweiten Tag der *in-vitro* Kultur wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, fixiert und immunozytologisch gegen das transfizierte eGFP-Protein gefärbt und die Längen der Neuriten vermessen. Wie in Abbildung 46

zu erkennen ist, haben sowohl der MR-Agonist Aldosteron wie auch der des GRs (Ru26988) in geringen Konzentrationen von 80 nM einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum der Neuriten. Bei höheren Konzentrationen nimmt dieses jedoch wieder ab. Der Antagonist Ru486 verursachte einen gegenteiligen Effekt. Dieser ist potent in der Lage, die Differenzierung zu inhibieren. Somit konnten die bereits in Neuro-2a-Zellen gefundenen Effekte (vergleiche hierzu Abbildung 22 bis Abbildung 24) auch in primären Neuronen reproduziert werden.

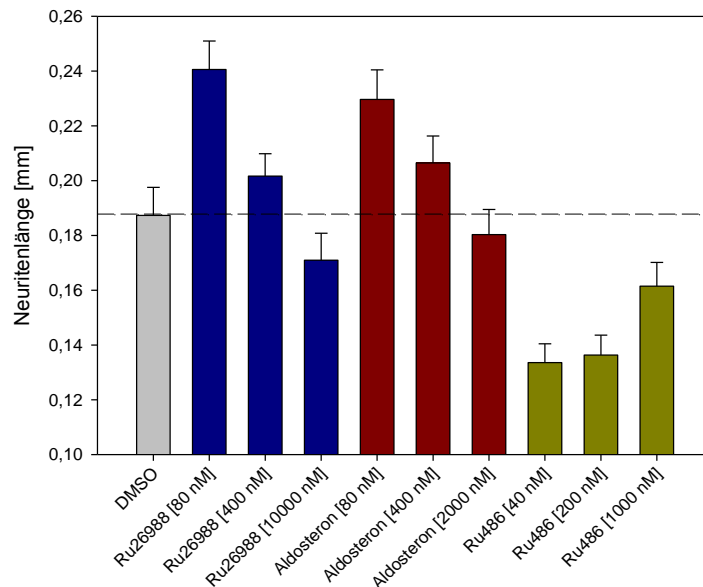


Abbildung 46: Steroide beeinflussend das Neuritenwachstum von hippocampalen E18 Neuronen. Hippocampale E18 Neuronen wurden an DIV0 mit eGFP transfiziert und mit DMSO- beziehungsweise steroidhaltigem Medium behandelt. An DIV2 wurden die Zellen mit PFA (4% in PBS) fixiert, immunzytologisch gegen eGFP gefärbt und die Neuritenlängen in Mehrfachbestimmungen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Es wurden sämtlich Neuriten der Zelle vermessen.

Letztendlich konnten wir die in Neuroblastoma-Zellen generierten Daten auf ein primäres neuronales Zellsystem direkt übertragen. Für die weitere Forschung empfiehlt sich daher unbedingt die Überlegung, ob weitere Daten, die mit Hilfe von N2a-Zellen erhoben wurden, ebenfalls auf hippocampale Neuronen übertragbar sind. Im Falle positiver Ergebnisse wäre gezeigt, dass FKBP51 durch dessen Regulation von Steroidhormonrezeptoren neuronale Differenzierungsprozesse zu beeinflussen vermag. Dies läge die Vermutung nahe, dass eine pharmakologische Modulation von FKBP51 in Neuronen möglich ist und somit pathologische Zustände, die durch FKBP51 verursacht werden, durch eine Blockade dieses Proteins verhindert beziehungsweise therapiert werden können.

5 Diskussion

5.1 Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die neuronale Plastizität

Ein von Stress geprägtes Leben kann wesentlich zu der Entwicklung einer Depression beitragen. Diese wissenschaftliche These konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit biochemisch untermauert werden. Zwar konnten bereits gewisse genetische Prädispositionen bezüglich der Entwicklung einer solchen stressbedingten Depression gefunden werden, jedoch sind elementarste Vorgänge im Gehirn, die zur Entstehung der Krankheit führen, noch bei weitem nicht ausreichend gut charakterisiert [192].

Unbestritten ist, dass aus der Nebennierenrinde sekretierte Glucocorticoide, wie sie beispielsweise in Stresssituationen vorkommen [4], problemlos ins Gehirn gelangen und dort mannigfaltige Effekte auslösen [174]. So konnte zum einen wiederholt festgestellt werden, dass bei depressiven Patienten sowohl die Cortisol-Spiegel wie auch die dadurch regulierte HPA-Achse den Verlauf der Krankheit nachhaltig beeinflussen. Solche Patienten weisen höhere Cortisol-Konzentrationen auf [8, 193] und sind deutlich resistenter gegenüber den Glucocorticoiden selbst, was letztlich zu einer fehlgeleiteten HPA-Achsen-Regulation führt [194]. Eine der berühmtesten Krankheiten, die mit Hypocortisolismus in Verbindung gebracht wird, ist das Cushing-Syndrom. Hier konnte belegt werden, dass durch eine chirurgische Korrektur die hohen Cortisol-Spiegel gesenkt werden konnten. Hiermit ging zusätzlich eine Besserung der depressiven Syndrome einher [195]. Auch wurde berichtet, dass sowohl bei Depressionen als auch bei anderen Angststörungen (wie PTSD) reduzierte Hippocampus-Volumina festgestellt wurden. Auf beeindruckende Art und Weise konnte bereits in Tiermodellen gezeigt werden, dass Stress markante Effekte auf die Entwicklung und Modellierung des Hippocampus bewirkt. Hierbei spielt nicht nur das Volumen, sondern vor allem auch eine Änderung der synaptischen Plastizität eine wichtige Rolle [196]. Es liegt daher beinahe auf der Hand, dass Systeme, welche zum einen der Adaption und zum anderen der Bewältigung von Stress dienen (wie die HPA-Achse), mit für plastische Regulationsprozesse im Gehirn verantwortlich sind. Versucht man in diesem Zusammenhang besagte Systeme weitestgehend auf relevante Botenstoffe zu reduzieren, so wird deutlich, dass Glucocorticoide einen signifikanten Einfluss auf diese Art von Regulation auszuüben scheinen und somit auf die Ausbildung einer Depression zentral einwirken können.

Auf welche Weise also kann die Struktur des Gehirns moduliert und somit eine Änderung auf neuronaler Ebene hervorgerufen werden? Die Antwort liefern u.a. zwei verschiedene Mechanismen: die adulte Neurogenese [197, 198] beziehungsweise das Absterben von Neuronen sowie die Remodulierung der strukturellen Plastizität [199]. McKittrick et al. etwa wiesen nach, dass es bei dominanten Ratten, die einem chronischen Stresstests ausgesetzt werden, zu einer höheren Verzweigung apikaler Dendriten von pyramidalen Neuronen der CA3-Region des Hippocampus kommt als bei rangniedrigeren Tieren [200]. Weiter stellten Liston et al. fest, dass Glucocorticoide dosisabhängig in der Lage sind, die Umwandlung dendritischer *Spines* innerhalb weniger Stunden zu erhöhen, während Antagonisten diese hemmen [124]. Dies soll vor Augen führen, dass nicht zwangsweise nur physiologische Faktoren, wie zum Beispiel die Funktion der Nebennieren, einen Einfluss auf die Plastizität des Hippocampus nehmen, sondern dass gerade auch Umweltfaktoren oder exogen zugeführter Stress diese nachhaltig beeinflussen können. Ein weiteres wichtiges Merkmal dieser Plastizität ist die Tatsache, dass sie reversibel ist.

Bislang sind Effekte, die Glucocorticoide auf neuronale Zellen ausüben, leider nur sehr vereinzelt und unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen untersucht worden. Dies führte dazu, dass unterschiedliche Gruppen teilweise sehr heterogene Ergebnisse präsentierten, die sich auf den ersten Blick nur schwer in einen großen Kontext einordnen lassen. Die vorliegende Arbeit soll unter anderem dazu beitragen, ein besseres Verständnis der Biologie von Steroidhormonrezeptoren im Rahmen neuronaler Entwicklung zu erlangen und damit auch deren mögliche Einflüsse auf die neuronale Plastizität besser zu verstehen. Aus diesem Grund stehen insbesondere die Steroidhormonrezeptoren der Nebennierenhormone vom Typ I (für Mineralcorticoide) und Typ II (für Glucocorticoide) im Zentrum dieser Abhandlung, da sie für die Effekte auf die neuronale Erregbarkeit sowie neurochemischen Vorgänge und die Plastizität mitverantwortlich gemacht werden [174, 199]. Eines der größten Probleme bisheriger Charakterisierungen von steroidalen Effekten liegt in der Tatsache, dass viele der beschriebenen Effekten auf Steroiden beruhen, die nur schlecht beziehungsweise gar nicht unter den verschiedenen Subtypen der Steroidhormonrezeptoren unterscheiden, sprich unselektiv sind. Als Beispiel sei an dieser Stelle Dexamethason und der GR-Antagonist Ru486 (Mifepriston) genannt. So bindet erstere Verbindung fast identisch gut an den GR wie auch an den MR [201, 202], während Ru486 neben dem GR hauptsächlich den Progesteronrezeptor (PR) antagonisiert [203]. Ein weiteres Problem besteht in den zumeist verwendeten Konzentrationen der Steroide. Viele Publikationen berichten von Konzentrationseffekten, die weit von physiologisch auftretenden Konzentrationen entfernt sind. So sind eingesetzte Konzentrationen in zellulären Assays zwischen 1 und 50 μM keine Seltenheit. Im Falle von Cortisol muss jedoch von basalen Plasmaspiegeln im Menschen von etwa 280 nM ausgegangen werden [204], während hippocampale Konzentrationen in Ratten (des Pendants

Corticosteron) etwa 2,8 nM betragen [205]. Betrachtet man nun die Tatsache, dass die Plasmaspiegel an Corticosteron in Ratten etwa 60 – 120 mal höher sind als jene im Hippocampus, so lässt sich daraus rückfolgern, dass auch beim Menschen die Konzentrationen der Stresshormone im unteren nanomolaren Bereich liegen werden. Weiter stellten Droste et al. fest, dass der Corticosteronspiegel in Ratten bei Stress um etwa das 16-fache steigt. Überträgt man solche Befunde auf den Menschen, so könnten die im Gehirn vorliegenden Konzentrationen an Cortisol in Stresssituationen ebenfalls um die 200 bis 400 nM betragen. Somit könnten die in dieser Arbeit in den Neuritenwachstumsassays untersuchten Steroidkonzentrationen ein repräsentatives Abbild der tatsächlichen physiologischen Situationen darstellen. Um Effekte des Mineralcorticoidrezeptors wie auch des Glucocorticoidrezeptors auf die Neuritogenese neuronaler Zellen zu untersuchen, setzten wir einen Agonisten des MRs, nämlich Aldosteron, der in den verwendeten Konzentrationen eine deutliche Selektivität zum MR im Vergleich zum GR aufweist, und Ru26988 (11 β ,17 β -dihydroxy-17 α -pregnan-1,4,6-trien-20-in-21-methyl-3-on) das umgekehrt eine höhere Affinität zum GR besitzt [206], in Neuritenwachstumsassays von Neuro-2a-Zellen ein. Zudem studierten wir die Effekte eines nicht-steroidalen Agonisten des GRs, der sich dadurch auszeichnet, dass er bevorzugt eine Transrepression und weniger die Transaktivierung des Steroidhormonrezeptors auslöst (R-16) [175]. Neben diesen Agonisten beleuchteten wir ebenfalls Antagonisten. Hierbei nutzten wir die MR-Antagonisten Spironolacton, Eplerenon und Ru28318 ((7 α ,17 α)-17-hydroxy-3-oxo-7-propylpreg-4-en-21-carboxylat) [207] sowie die GR-Antagonisten Ru486 und CORT108297 [208].

Die Ergebnisse unserer Experimente konnten klar belegen, dass verglichen mit unbehandelten Zellen die Verwendung von steroidal Agonisten zu einem signifikanten Anstieg der Neuritenbildung führt. Weiter stellten wir fest, dass dieser Effekt dosisabhängig war. So stiegen die Längen der neugebildeten Neuriten sowohl bei der Verwendung von Aldosteron als auch bei Ru26988 sukzessive von 0 bis 100 nM an (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23). Der Einsatz von Antagonisten beider Rezeptoren bewirkte einen gegenteiligen Effekt: Sie inhibierten die Differenzierung der N2a-Zellen bereits im unteren nanomolaren Bereich (Abbildung 24). Sehr interessant in diesem Zusammenhang sind die aktuell gewonnenen Erkenntnisse über den Liganden CORT108297. Zalachoras et al. zufolge, handelt es sich in diesem Fall nicht um einen reinen Antagonisten des GRs, sondern um einen Liganden, der zu den selektiven GR-Modulatoren zählt (SGRM) [209]. Demnach verfügt CORT108297, durch sein spezifisches Muster der Co-Faktor Rekrutierung über die Fähigkeit, sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte hervorzurufen. Einer der Vorteile, die diese Verbindung aufweist, ist die Tatsache, dass sie im Gegensatz zu Dexamethason oder Ru486 nicht auf die endokrine Kontrolle der HPA-Achse wirkt und daher Potenzial für den therapeutischen Einsatz hat. In unserem Test-Paradigma wies die Substanz klare antagonistische Eigenschaften des Modulationsverhaltens der Neuritogenese von N2a-Zellen auf.

Äußerst vielversprechend könnte in diesem Zusammenhang die Entdeckung der Meijer-Gruppe sein, deren eingesetzte Konzentration an CORT108297 unter anderem die Expression von BDNF-mRNA signifikant herabsetzte. Die mögliche Brisanz dieses Wachstumsfaktors im Kontext neuronaler Differenzierung wird später noch eingehender beleuchtet.

Zusätzlich zu den selektiven Inhibitoren testeten wir solche, die mehrere Rezeptoren gleichzeitig zu antagonisieren vermögen. So zeichnet Ru486 (Mifepriston) und Eplerenon die Fähigkeit aus, den Differenzierungsgrad der N2-a Zellen hemmen zu können. Als interessant stellten sich in diesem Zusammenhang besonders zwei Beobachtungen heraus: Wurde die Konzentration der Agonisten über ein Optimum hinaus erhöht, so stellte sich wieder eine Abnahme der Gesamtlängen ein. Dies galt sowohl für den MR als auch für den GR. Zudem stellten wir fest, dass der nicht-steroidale Ligand (R-16) im Bezug auf die Steigerung des Neuritenwachses nicht so potent zu agieren vermochte wie seine steroidal Vertreter. Dies könnte auf seinen postulierten Wirkmechanismus der Transrepression zurückzuführen sein. Unter Transrepression werden solche Effekte subsumiert, die Steroidhormonrezeptoren auslösen, indem sie im Kern durch Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren deren Aktivität herabsetzen und hierdurch die Expression relevanter Gene unterdrücken [210]. Diese Befunde führen zu einem zu der Schlussfolgerung, dass für die Quantität des Neuritenwachstums die einwirkende Konzentration der Liganden wichtig ist und zum anderen zu der Einsicht, dass unterschiedliche signaltransduzierende Mechanismen der Steroidhormonrezeptoren eine elementare Rolle in der neuronalen Differenzierung spielen. Bezogen auf die bimodale Wirkungsweise von GR- wie auch MR-Agonisten erlangten Anacker et al. ähnliche Ergebnisse wie die in dieser Arbeit dargelegten [211]. Sie zeigten ebenfalls, dass eine Stimulierung einer der beiden Rezeptoren mit jeweils 1 μM Dexamethason oder Aldosteron zu einem Rückgang der Differenzierung neuronaler Zellen führt. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen postulieren sie jedoch, dass die alleinige Aktivierung eines der beiden Signalwege genügt, um diesen Rückgang der Neuritenlängen zu induzieren, was einen Widerspruch zu den von uns festgestellten Fakten der neurotrophen Effekte geringer Steroidkonzentrationen darstellt. Weiter waren sie in der Lage durch Gabe eines Antagonisten (Spironolacton oder Ru486) besagten Effekt umzukehren, also den Rückgang der Neuriten zu stoppen. Unbedingt zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass die Forschungsgruppe beide Signalwege primär über die Konzentration an zugegebenem Cortisol zu steuern versuchte. Das bedeutet, dass die Signalwege entweder mit 100 nM Cortisol zur MR-Aktivierung oder 100 μM Cortisol für eine GR-Aktivierung angesteuert wurden. Die Verwendung dieses Steroids spiegelt zwar eine physiologische Situation, abgesehen von den Konzentrationen, deutlich besser dar, birgt jedoch die Gefahr von Artefakten, welche durch Unselektivität des Steroids bedingt sind. Gegen diese Befürchtung spricht allerdings die Tatsache, dass die Gruppe von Pariente diese Effekte durch Gabe selektiver Antagonisten wieder umkehren konnte. Zuletzt drängt sich in

diesem Zusammenhang jedoch die Frage auf, wieso die Kontrolle der Ergebnisse mit Hilfe von sehr hohen Agonist-Konzentrationen von Aldosteron (1 μ M) wie auch Dexamethason (1 μ M) durchgeführt wurden? Dies verwundert vor allem vor dem Hintergrund, dass beide Steroide deutlich besser als Cortisol an den jeweiligen Rezeptor zu binden vermögen [203]. Abschließend sei festgehalten, dass es sich im Falle der von Anacker et al. untersuchten Zellen um eine menschliche neuronale Zelllinie handelte, während die in dieser Arbeit untersuchten Neuroblastoma- wie auch Primären Zellen ausschließlich muriner Herkunft sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse legen die These nahe, dass sowohl transrepressive wie auch transaktivierende Einflüsse einen Effekt auf neuronale Differenzierung ausüben. Dies könnte zum einen durch die Modulation anti-inflammatorischer Mechanismen geschehen oder aber durch andere Signalwege beziehungsweise die Expression relevanter Gene, die wiederum unter der Kontrolle von MREs respektive GREs stehen. Entzündungshemmende Effekte von GCs werden vor allem durch Einflüsse ausgelöst, die auf einer Transrepression beruhen [212]. Da Steroide deutlich potenter als nicht-steroidale Verbindungen in der Beeinflussung des Differenzierungsgrades wirken, könnte die These aufgestellt werden, dass vor allem solche Effekte, die auf einer positiven Genregulation beruhen, diesen Prozess mitverantworten. Nichts desto trotz können additive Elemente aufgrund des Mangels an Liganden, welche sich ausschließlich durch transaktivierende Effekte auszeichnen, nicht ausgeschlossen werden, sodass die Klärung der Rolle von Transaktivierung und Transrepression in der neuronalen Differenzierung in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde.

Huang et al. stellten bereits fest, dass Dexamethason in hippocampalen Neuronen zur Phosphorylierung der Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) sowie zu erniedrigten Spiegeln an Protein Phosphatase I (PPI) führt [213]. Es ist weiter bekannt, dass beide Proteine eine essenzielle Rolle in der Langzeit-Potenzierung (LTP) einnehmen und somit relevant für die Modulation synaptischer Plastizität sind [214]. Zudem wurde gezeigt, dass die neonatale Behandlung mit Dexamethason und die damit einhergehenden Verringerung der LTP zu einer Erhöhung der Langzeit-Depression (LTD) in adulten Ratten führt [213].

Daneben wurden Glucocorticoide im Zusammenhang neuronaler Entwicklungsprozesse vor allem gemeinsam mit Wachstumsfaktoren diskutiert. So erarbeiteten Roskoden et al., dass die Gabe von Corticosteron zu einer bedeutenden Erhöhung der neurotrophen Faktoren NGF und NT-3 führt [215]. Zusätzlich kam es in diesen Versuchen zu einer deutlichen Erhöhung von TrkA, -B und -C Rezeptoren. Bei ihnen handelt es sich um Rezeptortyrosinkinasen, die spezifisch Neurotrophine binden. Die Aktivierung des TrkB-Rezeptors durch BDNF führt vor allem zu Signalwegen der PI3K und PLC γ sowie zu ERK-Signalen. Smith et al. belegten, dass sowohl Stress als auch zugeführte Glucocorticoide bereits nach zwei Stunden eine beträchtlichen Erhöhung an BDNF und NT-3 mRNA

im Hippocampus auslösen [216]. In diesem Zusammenhang überaus interessant sind Studien an kortikalen Neuronen in Zellkultur, die nachweisen, dass Glucocorticoide sowohl die Freisetzung von Neurotransmittern als auch die durch BDNF-induzierte Produktion synaptischer Proteine hemmen [217, 218]. Weiter fanden Jeanneteau et al. heraus, dass Glucocorticoide in der Lage sind, direkt mit TrkB zu interagieren und somit neben Neurotrophin-induzierten Signalen auch nicht-genomische, GC-vermittelte Antworten auslösen können [219]. Zusätzliche nicht-genomische Effekte, wie die Suppression glutamaterger Transmission im Hypothalamus sowie die reduzierte Freisetzung von Endocannabinoiden und Stickstoffmonoxid (NO), welche letztendlich zu einer erhöhten Freisetzung von GABA führen [220, 221], seien an dieser Stelle ebenso erwähnt, wie die Tatsache, dass Dexamethason eine GABAerge Signalweiterleitung durch die Interaktion mit membrangebundenem-GR pyramidalen Neuronen der CA1-Region zu potenzieren vermag [222].

Darüber hinaus zeigten Takahashi et al., dass agonistische Glucocorticoide in der Lage sind, die NMDA-Rezeptor(N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor) induzierte Erhöhung an Calcium-Signalen zeitlich weiter zu erhöhen [223]. Gleichzeitig sollte bei der Diskussion solcher kurzzeitigen Mechanismen im Zusammenhang mit der Modulation des Differenzierungsverhaltens von N2a-Zellen jedoch unbedingt berücksichtigt werden, dass eine endgültige Abschätzung der Verantwortung solcher nicht-genomischer Effekte für die Langzeiteffekte auf Neuronen nicht möglich ist.

Einen Zusammenhang von Glucocorticoiden und Neuritogenese liefern etwa Yang et al. [224], indem sie zeigten, dass die Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase 1 (SGK1) durch Mikrotubuli-Destabilisierung die Formierung von Neuriten in hippocampalen primären Neuronen zu erhöhen imstande ist. Die Forscher stellten fest, dass dieser Effekt durch Dexamethason hervorgerufen wird. In Bezug auf den Glucocorticoidrezeptor konnten Pepin et al. zeigen, dass Antidepressiva eine Erhöhung der GR-Expression in primären Neuronen herbeiführen [225], eine Tatsache, die wiederum die Wirkung von Antidepressiva mit Glucocorticoid-abhängigen Mechanismen verknüpft. Zudem besteht eine direkte Korrelation der Wirkung von Antidepressiva mit erhöhter BDNF-mRNA [226]. Erst kürzlich konnte außerdem der Beweis erbracht werden, dass BDNF in die Regulation der CRH- und damit der ACTH-Homöostase involviert ist [227]. Dabei induziert BDNF CRH durch die Beeinflussung von CREB-Signalwegen. Betrachtet man nun die gewichtige Position, die BDNF innerhalb der Modulation synaptischer Plastizität einnimmt, und die Möglichkeiten der Quervernetzung zwischen Steroidhormonrezeptor-Signalen und TrkB-Signalen, so könnte hier ein vielversprechender Zusammenhang bestehen. Schlussendlich kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass viele der hier besprochenen neurotrophen Mechanismen der Neurotrophine sowie deren Signalkaskaden entweder durch Glucocorticoide beeinflusst werden oder selbst Einfluss auf Steroidhormon-Signalen nehmen. Folglich könnten beide gemeinsam für die beschriebenen neuronalen Differenzierungsmuster verantwortlich sein.

5.2 Die Modulation neuronaler Differenzierung durch Co-Chaperone der Steroidhormonrezeptoren

Nachdem der Einfluss von Glucocorticoiden wie auch nicht-steroidale Agonisten beziehungsweise Antagonisten auf die Differenzierung neuronaler Zellen gezeigt worden war, widmete sich unsere weitere Forschung den Effekten von Proteinen, die Steroidhormonrezeptoren sowohl positiv als auch negativ zu regulieren in der Lage sind. So zeigten beispielsweise bereits Riggs et al. in einem Hefemodell, dass die Rezeptoraktivität des GRs durch FKBP52 erhöht werden kann und dieser Effekt wiederum durch FKBP51 direkt inhibiert wird [43]. Weiter scheint FKBP52 durch die Interaktion mit Dynein eine bessere Translokation des Rezeptors in den Kern zu ermöglichen [78], während FKBP51 hier ebenfalls inhibitorisch wirkt [161]. Zusätzlich vermindert FKBP51 die Hormonbindungsaffinität des GRs zu seinen Liganden deutlich [159]. Letztlich waren es aber Quinta et al., die erstmals herausstellten, dass die Immunophiline FKBP52 und FKBP51 unterschiedliche Differenzierungsmuster in N2a Zellen verursachen [158]. Sie korrelierten diesen Sachverhalt jedoch mit den unterschiedlichen Lokalisationen von FKBP52 und FKBP51 und Protein-Protein-Interaktionen, die nicht auf Steroidhormonrezeptoren beruhen.

Wir waren in der Lage, übereinstimmend mit den Ergebnissen von Quinta et al., aufzuzeigen, dass FKBP51 übereinstimmend mit seiner Aktivität auf den MR und GR [158, 172] auch das Neuritenwachstum von N2a-Zellen signifikant zu vermindern vermag. Im Gegensatz dazu konnten wir durch Überexpression von FKBP52 überdies einen Phänotypen charakterisieren, welcher sich durch erhöhte Neuritogenese auszeichnet (Abbildung 10). Auch stellten wir fest, dass die aktivierenden Effekte von FKBP52 durch die Induktion von FKBP51, genauso wie die inhibierenden Effekte von FKBP51 durch die Überexpression von FKBP52, aufgehoben werden können. Unterschiedliche Gruppen zeigten bereits, dass solche direkten antagonistischen Effekte beider Proteine charakteristisch für die Regulation von Steroidhormonrezeptoren sind [43, 80, 161]. Um die Möglichkeit der Involvierung von Steroidhormonrezeptoren in Effekte, die durch FKBP5s ausgelöst werden, zu überprüfen, testeten wir eine Mutante von FKBP51, deren TPR-Domäne derart verändert war, dass sie nicht mehr mit Hsp90 interagieren und somit auch nicht mehr an dem Heterokomplex binden konnte. Im Gegensatz zu der Wildtyp-Version von FKBP51 vermochte diese Mutante (FKBP51_TPRmut) nicht inhibierend auf das Neuritenwachstum zu wirken. Eine weitere Mutation in FKBP51, welche zum Verlust der PPIase-Aktivität des Proteins führte, war in diesem Assay dagegen noch genauso aktiv wie FKBP51 selbst (FKBP51_PPIasemut). Beide Ergebnisse erhärten die These, dass es sich hierbei um Effekte handelt, die auf Steroidhormonrezeptoren beruhen (Abbildung 13).

Zusätzlich testeten wir, ob verschiedene Homologe aus unterschiedlichen Organismen entweder eine ähnliche oder gar unterschiedliche Neuritenentwicklung zur Folge haben. So stellte bereits die Gruppe von Scammel eindrucksvoll unter Beweis, dass die FKBP51-Version der Primaten der Neuen Welt deutlich potenter in ihrer Inhibition des Glucocorticoidrezeptors ist als die humane Version [82, 159, 228]. Auch wir waren in der Lage, mit Hilfe eines radioaktiv Bindungsassays solche Effekte im Bezug auf die Hormonbindungsaffinität des GRs zu reproduzieren (Abbildung 27). Zusätzlich konnten wir im Neuritenwachstums-Assay einen Effekt des Homologs aus dem Totenkopffäffchen nachweisen, der den der humanen Version übersteigt. Ein weiteres Indiz, dass GR und MR in die Regulation der Neuronenentwicklung eingebunden sind.

Um schließlich zu klären, ob die von FKBP52 ausgelöste Differenzierung abhängig von der Menge an exprimiertem FKBP52 ist, wurden N2a-Zellen in unterschiedlichen Mengen mit FKBP52-Plasmid transfiziert. Im Vorfeld konnte bereits wiederholt gezeigt werden, dass unterschiedliche Mengen transfizierter Immunophiline die Expressionsprofile von HRE-gesteuerten Genen, abhängig von dem Effekt des jeweiligen Immunophilins auf den Rezeptor, modulieren. Ni et al. etwa bestätigten in einem Reporterassay, dass FKBP51 die Signaltransduktion des Androgenrezeptors erhöhen kann. Hierbei führte eine Erhöhung transfizierter FKBP51-Mengen gleichzeitig zu einer Erhöhung des AR-Signals beziehungsweise zu einer Erhöhung der Expression ARE-regulierter Genabschnitte [86]. Weiter stellten Wochnik et al. fest, dass die durch FKBP51 hervorgerufene Inhibition des GRs im Reporterassay durch sukzessive Erhöhung von FKBP52 ebenfalls dosisabhängig aufgehoben werden kann. Es wurde ein von der Menge des transfizierten Plasmids abhängiger Effekt dokumentiert [161]. Auch wir entdeckten einen von der transfizierten Plasmidmenge abhängigen Mechanismus bezogen auf die neuronale Differenzierung des N2a-Zellsystems. So stieg die Länge der neugebildeten Neuriten proportional mit der exprimierten Menge an FKBP52 (Abbildung 11). Ob dieser Effekt letztendlich ausschließlich auf FKBP52 beruht oder ob das Protein in diesem Modell gegebenenfalls Effekte, die von endogenem FKBP51 hervorgerufen wurden, antagonisiert, konnte an dieser Stelle noch nicht endgültig geklärt werden. Ein solcher Mechanismus wurde bereits von Wochnik et al. postuliert. Sie zeigten, dass sich FKBP52 in Säugern vor allem durch seine FKBP51-antagonisierenden Effekte auszeichnet. Jedoch weisen die bis zu diesem Punkt beschriebenen Ergebnisse – sowohl der Einfluss von Steroiden wie auch der von Steroidhormonrezeptor regulierenden Immunophilinen – deutlich auf eine mechanistische Bedeutung von Steroidhormonrezeptoren im Kontext von neuronaler Differenzierung hin.

Mit der Gewissheit, dass FKBP51 das Wachstum der Neuriten inhibieren kann, sowie dem Wissen, dass FKBP51 unter Expressionskontrolle des GRs steht, fragten wir uns, ob in diesem Zusammenhang eine Verbindung zu der Beobachtung besteht, dass Agonisten beider Rezeptoren in niedrigen Konzentrationen zunächst einen positiven Effekt auf die Zelldifferenzierung von N2a Zellen

in Gang setzen und bei höheren Konzentrationen wiederum ein Rückgang auf Basalniveau festzustellen ist. Dieser Effekt könnte auf eine erhöhte Expression von FKBP51, die aus der hohen Steroidkonzentration und der damit verbundenen Aktivität des GRs resultiert, zurückgehen. Hierfür überprüften wir in einem Vorläuferexperiment (Abbildung 25), ob die Überexpression von FKBP51 in Zellen, die zusätzlich mit Agonisten oder Antagonisten des MRs und des GRs behandelt wurden, weitere additive Effekte bewirkt. Das Ergebnis: Die mit DMSO behandelten Kontrollzellen konnten erneut die bereits beschriebenen, durch Expression von FKBP51 verursachten, kürzeren Neuriten bilden, während die mit einem der beiden Agonisten behandelten N2a-Zellen sowohl bei der Expression des pRK5-Kontrollvektors als auch von FKBP51 zunächst über dem Basalniveau lagen. Ein positiver Effekt durch die Agonisten war deutlich zu erkennen. Wir setzten in diesem Fall bewusst die Konzentration an Agonisten ein, die sich während der Titration der Steroide als die potenteste erwiesen hatte. Entgegen der Erwartungen, löste die zusätzliche Expression von FKBP51 in den Zellen jedoch keinen deutlichen inhibitorischen Effekt aus. Zwar waren Tendenzen rückläufiger Differenzierung der Zellen durch FKBP51 zu erkennen, jedoch fielen diese bei weitem nicht so prägnant aus wie die bereits beschriebene Neuritenwachstumshemmung durch FKBP51 (siehe beispielsweise Abbildung 10). Dies kann unterschiedliche Gründe haben: Zum einen ist die Überexpression eines Proteins durch die Transfektion des Plasmids nicht mit einer endogenen Expression des Proteins durch die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors vergleichbar. Regulative Mechanismen, die sich in der Zelle abspielen, könnten daher beispielsweise nicht greifen. Zum anderen verhält es sich in den von uns durchgeführten Versuchen so, dass die humane Version von FKBP51 in Neuro2a-Zellen durch die Transfektion eines Plasmids überexprimiert wurde. Somit könnte der Unterschied der humanen FKBP51-Version zu der murinen die differenten Effekte in Kombination mit Steroiden erklären. Aus diesem Grund ist der postulierte Regulationsmechanismus (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23 – Glockenkurven), nämlich die durch hohe Steroidkonzentrationen hervorgerufene Expression von endogenem, murinem FKBP51 und der damit verbundene Rückgang der Differenzierung, generell nicht widerlegt. Menge und Art des exprimierten FKBP51 kann hierbei von entscheidender Bedeutung sein. Fraglich bleibt jedoch, ob FKBP51 alleine durch die Inhibition von SHRs oder durch andere, zusätzliche Effekte den Neuritenrückgang bewirkt.

Was im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen unbedingt diskutiert werden muss, ist die Tatsache, dass die Überexpression von humanem FKBP51 bislang immer zu einer signifikanten Reduktion der Neuritenlängen geführt hat (Abbildung 10). In besagtem Experiment hingegen trat dieser Effekt nur noch schwach auf (Abbildung 25). Grund hierfür sind die zusätzlich vorhandenen steroidalen Agonisten. So scheinen durch Verwendung der effektivsten Konzentrationen, nämlich 30 nM Ru26988 oder 100 nM Aldosteron, neurotrophe Mechanismen ausgelöst zu werden (vergleiche hierzu auch Kapitel 5.1), die den Effekten des humanen FKBP51 entgegenwirken. Dies deutet

zusätzlich darauf hin, dass FKBP51 in seiner neuronalen Regulation nicht nur die Inhibition von SHRs verursacht, sondern darüber hinaus auch andere Proteine beeinflusst.

Daraus ergibt sich die Frage, über welche weiteren Effektoren FKBP51 neben Steroidhormonrezeptoren verfügen kann? Eine im Zusammenhang mit neuronalen Systemen sehr aussichtsreiche Proteinfamilie stellen TRP-Kanäle dar (*canonical transient receptor potential channel*). So zeigten Shim et al., dass FKBP52 in der Lage ist, TRPC1 zu regulieren und dadurch das Entwicklungsverhalten axonaler Wachstumskegel mit zu beeinflussen [229]. In diesem Fall war jedoch die Isomerase-Aktivität des Immunophilins Voraussetzung für die erfolgreiche Modulation von TRPC1. Könnte folglich auch FKBP51 TRPCs binden beziehungsweise modulieren? Cioffi et al. berichten in diesem Kontext von bis dato unpublizierten, vorläufigen Ergebnissen, die Interaktionen von FKBP51 mit TRPC1 und TRPC4 beweisen sollen [230]. Bestätigen konnten sie diese Theorie letztlich 2013, indem Kadeba et al. aufzeigten, dass gegensätzliche Eigenschaften von FKBP51 und FKBP52 insofern eine Rolle spielen, dass neben FKBP52 auch FKBP51 an TRPC4 zu binden vermag und beide in antagonistischer Weise den Calcium Influx in Zellen modulieren [231]. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass auch TRPC5 mit FKBP52 interagiert [232]. Neben diesen Calcium-Kanälen beeinflusst FKBP51 außerdem den Zellwachstumsregulator Akt (PKB – Protein Kinase B) negativ. Hierbei bindet FKBP51 sowohl an Akt als auch an die Phosphatase PHLPP (*PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases*) und löst dadurch eine Dephosphorylierung und die damit verbundene Inaktivierung von Akt aus [233]. Fabian et al. zeigten, dass durch die Verwendung von FKBP51-Inhibitoren dabei die Dephosphorylierung von Akt unbeeinflusst bleibt [234]. Somit kann, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen, in jener Versuchsanordnung die Modulation des Schlüsselproteins durch Inhibitoren von FKBP51 nicht beeinflusst werden. Folglich erscheint es fraglich, ob Signalwege über Akt auch in dem von uns beschriebenen Mechanismus von Relevanz sind.

Ein weiteres von FKBP51 reguliertes Protein, welches vor allem im ZNS auftritt, ist das an Mikrotubuli assoziierte Tau-Protein. Dieses Protein spielt vor allen in neurodegenerativen Krankheiten eine zentrale Rolle. Jinwal et al. zeigten, dass FKBP51 Tau stabilisiert und abhängig von der intrinsischen PPlase-Aktivität dessen Phosphorylierungsstatus regulieren kann. Dies könnte letztendlich zur Bildung neurotoxischer Aggregate führen und zusätzlich das neuronale Differenzierungsverhalten mitbeeinflussen [87]. Die Arbeitsgruppe dokumentierte hierbei jedoch eine deutlich PPlase-Abhängigkeit, die in der Regulation von Steroidhormonrezeptoren allerdings keine Rolle spielt und die abweichenden Ergebnisse dieser Arbeit erklärt [82, 162]. Zuletzt sei im Zusammenhang anderer, nicht-steroidaler Signalwege, die durch FKBP51 beeinflusst werden können, NF- κ B erwähnt. Es ist bekannt, dass die Überexpression von FKBP51 unter anderem zur Reduktion des Inhibitors von NF- κ B (I κ B) sowie zu einer Verbesserung der NF- κ B-DNA-Interaktion und

letztendlich zu einer Verstärkung des NF- κ B-Signalwegs führt [235]. Jedoch scheint auch dieser Mechanismus von der PPIase-Aktivität des Immunophilins abhängig zu sein. Schlussendlich demonstrierten Romano et al., dass die Ausschaltung von FKBP51 zu einer Stabilisierung von I κ B führt [236] und wiesen damit nach, dass FKBP51 in die Regulation von apoptotischen Prozessen involviert ist [237]. Als sehr interessant im Zusammenhang mit den zuvor beschriebenen Effekten von Steroiden stellen sich Wechselwirkungen von NF- κ B mit Steroidhormonrezeptoren dar. So können durch die Aktivierung von NF- κ B die Transaktivierungs-Mechanismen des GRs blockiert werden. Umgekehrt übt der aktive GR jedoch seine transrepressiven Eigenschaften durch das Binden und Blockieren anderer Transkriptionsfaktoren, unter anderem von NF- κ B, aus [46, 238]. Eine endgültig klärende Aussage bezüglich der durch FKBP51 hervorgerufenen Effekte beziehungsweise der durch die Agonisten angestoßenen Mechanismen in neuronalen Zellen konnte an dieser Stelle noch nicht getroffen werden. Dies ist mitunter auf die bisher ungelöste Schwierigkeit zurückzuführen, besagtes Immunophilin selektiv zu blockieren. Daher wird diese Fragestellung an späterer Stelle noch einer genaueren Analyse unterzogen.

Im Falle der Antagonisten entsprach das Differenzierungsverhalten der neuronalen Vorläuferzellen exakt den Erwartungen. Sämtliche Antagonisten verursachten einen signifikanten Rückgang der Differenzierung. Hierbei fällt auf, dass der GR-Antagonist eine potentere Wirkung als die alleinige Expression von FKBP51 entfaltet. Die Antagonisierung des MRs führt ebenfalls zu niedrigeren Differenzierungsmustern, jedoch liegen diese nur schwach über den durch FKBP51 verursachten Rückgängen. Folglich hat eine zusätzliche Expression von FKBP51 in Zellen, die mit den Antagonisten behandelt wurden, nur im Falle des MRs einen weiteren Rückgang der Absolutlängen zur Folge. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass beide Rezeptoren im Bezug auf die Neuritenbildung eine nicht zu gering einzuschätzende Position einnehmen und der GR in dieser Konstellation eine noch wichtigere, regulatorische Stellung innehat als der MR. Folglich waren wir in der Lage, aufzuzeigen, dass sowohl Signale des MRs wie auch des GRs neurotroph auf N2a-Zellen wirken. Eine Aktivierung eines der beiden Rezeptoren genügte dabei, um die Differenzierung der Zellen auszulösen. Auf den ersten Blick mag der Umstand, dass eine Inhibition nur eines der beiden Rezeptoren direkt zu einer Verringerung des Neuritenwachses führt, seltsam erscheinen – würde man hier doch in erster Linie vermuten, dass die Aktivität des anderen Rezeptors ausreicht, um die Differenzierungsmechanismen der Zellen aufrecht zu erhalten. Die Ergebnisse lassen jedoch darauf schließen, dass Neuro2a-Zellen eine gewisse Grundaktivität beider Rezeptoren benötigen, um eine Differenzierung der Zellen zu ermöglichen. Weiter scheinen sich die unter Kontrolle von MRE beziehungsweise GRE stehenden Proteine, welche durch Aktivierung der SHRs exprimiert werden, zu unterscheiden. So könnten beispielsweise unterschiedliche Wachstumsfaktoren durch MR- und GR-Signale induziert werden, die gemeinsam nicht nur für ein verstärktes Differenzierungsmuster,

sondern generell für die Differenzierung der Zellen verantwortlich sind. So führt die Antagonisierung nur eines der beiden Rezeptoren zu der Verringerung der Differenzierung.

Eine andere Erklärung für die beobachteten Phänotypen könnten die Mechanismen von Antagonisten nukleärer Rezeptoren liefern. So ist bekannt, dass sich MREs und GREs nicht nur sehr ähnlich sind, sondern häufig auch dasselbe Gen zu regulieren in der Lage sind. Dabei können die REs beide Rezeptoren entweder dicht hintereinander liegen oder im selben Promotor vorhanden sein [239, 240]. Durch die Bindung eines Antagonisten bindet ein nukleärer Rezeptor negative Co-Regulatoren. So führt etwa die Bindung von Ru486 zur Rekrutierung der Nukleären Co-Repressoren 1 und -2 (NCoR1 und -2) [209]. Diese verhindern, abhängig von dem jeweiligen Rezeptor und dem Gewebe, in dem sie exprimiert werden, zum einen eine Translokation in den Kern oder auch eine höhere Packungsdichte des Chromatins. Weiter werden hierbei Histonacetyl-Transferasen (HDACs) rekrutiert, welche eine Deacetylierung von Lysinresten der Nucleosomen verursachen [241, 242]. Hierdurch wird die positive Ladung erhöht, was in einer stärkeren Wechselwirkung mit negativen Phosphatgruppen der DNA resultiert. Die Kompaktierung der DNA verhindert somit die Translation relevanter Gen-Abschnitte. Bedenkt man nun, dass sich MREs und GREs häufig auf ähnlichen oder gar den gleichen DNA-Abschnitten befinden, so ist es denkbar, dass durch eine negative Co-Regulation beispielsweise des MRs eine Kompaktierung der DNA-Bereiche hervorgerufen wird, in denen sich GREs befinden. Hierdurch können neben den unter Kontrolle des MR-Promotors stehenden Genen auch die des GRs nicht mehr transkribiert werden. So ist es denkbar, dass durch die Blockade eines der beiden Rezeptoren auch die Proteine, die unter der Kontrolle des anderen Rezeptors stehen, nicht mehr exprimiert werden. Folglich würden MR-Antagonisten eine indirekte Wirkung auf GR-Strukturgene verursachen. Weiter zeigten Ou et al., dass beide Rezeptoren in der Lage sind, zu heterodimerisieren und gemeinsam als Transkriptionsfaktor aufzutreten. Demnach ist es gerade auch vor dem Hintergrund, dass Agonisten beider Rezeptoren ähnliche positive Effekte auslösen, möglich, dass MRE/GRE-Genabschnitte für die hier beschriebenen Effekte von Agonisten wie auch Antagonisten verantwortlich sind [243].

Schließlich lässt sich festhalten, dass das Protein FKBP51 eine inhibierende Wirkung auf die Neurogenese auszeichnet, während FKBP52 durch fördernde Einflüsse charakterisiert werden kann. Ob dieses gegensätzliche Verhalten alleine durch Einflüsse beider Immunophilinen auf entsprechende Steroidhormonrezeptoren erklärt werden kann, ist allerdings fraglich. Wahrscheinlicher scheint die These, dass FKBP51 neben der Modulation der SHRs in einer zweiten Phase auch sekundäre Effekte auszuüben scheint und dadurch negativ auf die Neuroentwicklung wirkt. Fraglich bleibt in diesem Zusammenhang jedoch die Diskussion der durch die Überexpression von FKBP51 in Kombination mit steroidal Agonisten erhaltenen Daten. Sollte FKBP51 tatsächlich ein derart wichtiger Einfluss zugeschrieben werden können, so müsste die Expression von FKBP51

trotz Anwendung des GR- beziehungsweise MR-Agonisten beinahe zwingend ebenfalls einen inhibierenden Effekt ausüben. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Zwar ist sehr wohl ein leichter Effekt durch FKBP51 zu erkennen, jedoch ist dieser bei weitem nicht so dominant wie in den Titrationskurven. Hierfür könnte es unterschiedliche Erklärungen geben. Zum einen wurden während der Durchführung der Versuche die Expressionsmengen von FKBP51 nicht exakt kontrolliert. Dies lässt die These zu, dass die Protein-Konzentrationen von FKBP51 in der Zelle durch eine GR- beziehungsweise MR-Induktion deutlich über dem des exogen zugeführten FKBP51 lagen. Entsprechend könnten im Falle der transfizierten Zellen die Mengen an exprimierten FKBP51 niedriger gewesen sein als durch die endogene Expression, was wiederum zu einem schwächeren Phänotyp führen könnte und damit zu einem geringeren Rückgang der Differenzierung. Weiter wurden die beschriebenen Daten in einem murinen Zellsystem generiert. Bei den Transfektionsversuchen wurde jedoch die humane Version von FKBP51 exprimiert. So können weitere unterschiedliche Effekte von humanem FKBP51 auf den murine SHRs im Vergleich zu endogenem FKBP51 mit einer Rolle gespielt haben. Weiter ist es möglich, dass beide FKBP51 unterschiedliche Effektoren besitzen, welche die Neuritenwachstumsinhibition auslösen. Denkbar wäre etwa, dass humanes FKBP51 in der Lage ist, NF- κ B-Signalwege zu modulieren und hierdurch besagte Effekte auszulösen. Sollte solch eine Signalintegration zu einer Reduktion des Differenzierungsverhaltens führen, wäre eine Erhöhung der Konzentration steroidaler Agonisten eine Erklärung für die Aufhebung der Inhibition durch FKBP51. Wie weiter oben bereits beschrieben, können nämlich GR- wie auch MR-Agonisten durch eine Transrepression andere Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, hemmen. Sollte im Umkehrschluss murines FKBP51 seine Wirkung also nicht über NF- κ B, sondern andere Mediatoren auslösen, wäre dies eine Erklärung für die Hemmung der Neuritenbildung ab einer Agonisten-Konzentration über 100 nM infolge einer konsequenten Erhöhung des Agonisten und der sich anschließenden hohen Expression an murinem FKBP51. Aus diesem Grund bedürfen Signalwege, welche durch FKBP51 reguliert werden können, in naher Zukunft unbedingt weiterer wissenschaftlicher Untersuchung. Hierbei wäre vor allem interessant, ob die murine Variante von FKBP51 einen sich von der humanen Version unterscheidenden Effekt bewirkt. In diesem Zusammenhang kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass neben dem unter SHR-Kontrolle stehenden und durch Agonisten induzierten FKBP51 auch noch weitere, für die Zelldifferenzierung relevante Proteine, mitinduziert wurden und dass diese gegebenenfalls einen gewichtigeren Effekt auf die Zellen bewirkten, als die alleinige Expression von FKBP51. Diese Problematik wurde im Rahmen nachfolgender Experimente durch eine selektive Blockade der FK1-Domäne zu erklären versucht (siehe weiter unten). Ähnlich positive Effekte durch FKBP52, wie in dieser Arbeit beschrieben, konnten von Gold et al. bestätigt werden. So assoziierten sie durch den Immunophilin-Liganden FK506 verursachte, neurotrophe Prozesse mit FKBP52 und zeigten, dass eine Blockade

desselbigen einen Rückgang der neurotrophen Wirkung in SH-SY5Y Zellen verursacht [71]. Es galt somit in nachfolgenden Versuchen zu klären, ob und inwieweit FKBP51, aber auch FKBP52 alleine für die beschriebenen Effekte verantwortlich sind und wenn ja, ob es möglich ist, solche Effekte pharmakologisch zu beeinflussen – was letzten Endes eine Aussage darüber ermöglichen würde, ob pathophysiologische Folgen dieser Proteine in vivo medikamentös kontrolliert werden können.

5.3 Der Einfluss von Immunophilin-Liganden auf die neuronale Differenzierung

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigten sich bereits mit den Effekten von Immunophilin-Liganden auf zelluläre Veränderungen im Bereich der Proliferation und Differenzierung. Hierbei dienten die dem FK506 wie auch Rapamycin zugeschriebenen, positiven neurotrophen Effekte als Stein des Anstoßes [244]. Im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson wurden vor allem primäre Zellkulturen, aber auch unterschiedliche neuronale Zelllinien auf das Zellüberleben und den Schutz vor Stressoren hin untersucht. Weiter wurde deren Neuriten-Wachstumsverhalten als *in-vitro*-Marker für die Differenzierung studiert [189]. Dies kann als Äquivalent neuronaler Entwicklung und Plastizität angesehen werden. Die biochemischen Mechanismen, auf denen Effekte solcher Liganden beruhen, sind bislang nur unzureichend geklärt. Zudem soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass auch die Dosis-Wirkungsbeziehungen besagter Liganden auf neuronale Zellsysteme öfter einen komplexeren Verlauf nehmen und nicht traditionelle sigmoide Charakteristika aufweisen [245]. So bilden zahlreiche neurotrophe Substanzen in ihrer Wirkung einen Glockenkurven-Verlauf (*U-shaped curve*) aus, was wiederum bedeutet, dass niedrige Konzentrationen positive Effekte bewirken und höhere einen Rückgang des ausgelösten Effekts zur Folge haben. Ein Nachteil in der praktischen Anwendung eines solchen Wirkprofils ist die geringe therapeutische Breite der Substanz, da Plasmaspiegel beziehungsweise ZNS-Konzentrationen sehr exakt eingehalten werden müssten. Außerdem interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass sich ähnliche glockenkurvenförmige Verhalten auch in unterschiedlichen stressphysiologischen Paradigmen wiederfinden. So zeigten beispielsweise Park et al., dass hippocampale Funktionen, wie das räumliche Gedächtnis, vor allem dann optimal funktionieren, wenn die zirkulierenden Corticosteron-Spiegel in einem moderaten Bereich liegen. Wurden diese künstlich erniedrigt oder durch Stress deutlich erhöht, so resultierte dies in neurologischen Effekten, deren graphische Darstellung in Abhängigkeit der vorhandenen Corticosteron-Konzentration ebenfalls einer Glockenkurve entspricht [246].

Seit den neunziger Jahren werden Immunsuppressiva ebenfalls mit neuritenwachstumsfördernden Prozessen in Verbindung gebracht. So zeigten Constantini und Isacson, dass FK506 in der Lage ist, die Neuritenbildung von primären Neuronen zu verbessern und der Wirkstoff dabei in glockenförmigen Kurven zur Entfaltung kommt [247]. Ähnliche Verhalten stellten sie auch bei der Verwendung von CsA fest. Sie assoziierten die gefundenen Effekte mit Signalwegen, die Calcineurin involvieren, da nur solche Verbindungen eine Wirkung entfalteten, die die Phosphataseaktivität von Calcineurin zu inhibieren vermochten. Rapamycin wurde in diesem Fall nicht als Agens beschrieben,

das längere Neuriten hervorruft, sondern vielmehr als Substanz, die in der Lage ist, den Verästelungsgrad von Neuronen zu beeinflussen. Folglich kann Rapamycin auf eine andere Art Einfluss auf neuronale Differenzierungsprozesse nehmen. Eine weitere Hypothese dieses Prozesses, nämlich die Involvierung von FKBP12, konnte von der Gruppe Bruce Golds widerlegt werden. Sie zeigten, dass die beschriebenen Vorgänge ebenfalls in FKBP12-*knock-out*-Zellen beobachtet werden und dass Immunophilin-Liganden, die nicht immunsuppressiv sind, gleiche Effekte bewirken [65].

Eine der wissenschaftlich bislang kaum diskutierten Fragen in diesem Zusammenhang ist die Bedeutung von FKBP51 und FKBP52. Um uns dieser Problematik anzunähern, untersuchten wir zunächst die Effekte bekannter immunsuppressiver Immunophilin-Liganden wie FK506 und Rapamycin, aber auch solcher Verbindungen, die nicht mehr in der Lage sind, Einfluss auf das Immunsystem zu nehmen (Antascomycin und FK1706, siehe Abbildung 33 und Abbildung 34). Ähnlich wie in den bereits beschriebenen Publikationen konnten auch wir Auswirkungen aller Liganden auf die neuronale Differenzierung von N2a Zellen feststellen. FK506 erhöhte die Durchschnittslängen von Neuriten in Konzentrationsbereichen, die auch schon von Constantini und Isacson beschrieben wurden. Darüber hinaus stellten wir bei den Liganden FK506, FK1706 und Antascomycin ab Konzentrationen um die 100 nM ein Abfallen der Neuriten auf Basalniveau fest. Diese Effekte sind bereits ausreichend diskutiert, interessant in diesem Zusammenhang sind jedoch die von Rapamycin ausgelösten Differenzierungsmuster. Ähnlich zu den Entdeckungen von Constantini und Isacson erhöhte diese Verbindung nicht die Generation von Neuriten, sondern wirkte inhibierend auf sie ein. Inwieweit sich die Zahl der neu gebildeten Neuriten veränderte, konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht näher untersucht werden, wird aber Bestand zukünftiger Experimente sein. Mit anderen Gruppen übereinstimmend stellten wir jedoch fest, dass die klassischen Immunophilin-Liganden, welche zunächst in niedrigen Konzentrationen eine Verlängerung der Neuriten verursachten, nach Erreichen einer optimalen Konzentration und weiterer Erhöhung dieser Konzentration, zu einem deutlichen Rückgang auf das Ausgangsniveau führten. Dies ist ein Mechanismus, der für eine mögliche Therapie nur allzu ungünstig ist. Interessant sind in diesem Kontext Beobachtungen, dass Antidepressiva in Zellkultur-Versuchen ähnliche Effekte verursachten. Beispielsweise konnten Takebayashi et al. in PC12 Zellen differenzierungs-stimulierende Effekte von Imipramin und Fluvoxamin feststellen [248].

Um zu überprüfen, inwieweit FKBP51 einen Einfluss auf die Inhibition der Zelldifferenzierung von Neuronen hat, nutzten wir eine Methode, die es uns ermöglichte, gezielt FKBP51-Mutanten zu inhibieren. Hierfür generierten wir eine Punktmutation in FKBP51 (FKBP51F67V), die einen von uns synthetisierten Liganden mit bis zu 1000-fach höherer Selektivität zu binden vermochte, als die Wildtyp-Version desselben Proteins. Auf diese Weise konnten wir nicht nur nachweisen, dass FKBP51F67V ebenso potent bezüglich der Differenzierungsinhibition agierte wie sein endogenes

Homolog, sondern auch, dass die selektive Blockade dieses Proteins zu einer Aufhebung des generierten Effekts führte. In Kontrollreaktionen, in denen selbiger Ligand entweder nur „gegen“ endogenes FKBP51 oder überexprimiertes Wildtyp-FKBP51 eingesetzt wurde, bewirkte er entweder keinen Effekt auf die Differenzierung oder hemmte die von FKBP51 ausgelösten zellulären Mechanismen nicht (Abbildung 17). Ebendieses Prinzip konnten wir anschließend auch für FKBP52 anwenden. Durch die Einführung der Punktmutation in das Protein waren wir ebenfalls in der Lage durch selektive Inhibition die von FKBP52 ausgelösten Effekte wieder zu blockieren (Abbildung 19). Um dieses System abschließend erklären zu können, führten wir schließlich ein weiteres Experiment mit besagtem Liganden durch. Hier exprimierten wir Kombinationen aus FKBP51 und FKBP52 sowie deren Punktmutanten und studierten die entstehenden Effekte der selektiven Inhibition. Das Ergebnis: Zum einen konnten wir zeigen, dass beide Proteine direkte, antagonistische Effekte auf die Entwicklung der N2a Zellen verursachten, zum anderen gelang uns der Nachweis über die Möglichkeit der sehr selektiven Blockade dieser Effekte durch den Einsatz passender Inhibitoren (Abbildung 20). Somit waren wir erstmals in der Lage, die Inhibition von FKBP51 als ein neurotrophes pharmakologisches Konzept zu validieren.

Eine der wichtigsten Herausforderungen im Bezug auf einen möglichen pharmakologischen Einsatz von FKBP51-Inhibitoren ist die Entwicklung selektiver Substanzen. So konnten wir deutlich zeigen, dass neuronale Entwicklungsprozesse von FKBP51 negativ beeinflusst werden, FKBP52 jedoch in der Lage ist, positiv zu wirken. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Gruppen zum Ausdruck gebracht, die differenzierungsfördernde Effekte unter anderem mit FKBP52 in Verbindung brachten [71, 249]. Aus diesem Grund ist eine gleichzeitige Inhibition von FKBP52 und FKBP51 keinesfalls von Vorteil. In beeindruckender Weise konnten Gaali et al. Inhibitoren für FKBP51 entwickeln, die im Gegensatz zu den gängigen Immunophilin-Liganden FKBP51 mit weit über 1000-facher Selektivität antagonisieren, ohne dabei FKBP52 zu beeinflussen [91]. Dies ermöglichte uns, erstmals Effekte zu studieren, die auf selektiver, pharmakologischer Blockade von endogen exprimiertem FKBP51 beruhen (Abbildung 36). Im direkten Vergleich mit dem Wirkprofil von FK506 fällt auf, dass zu Beginn der Titrationskurve durch die selektive Inhibition von FKBP51 ebenfalls ein Anstieg der Neuritenlängen zu verzeichnen ist, welcher sich nach Erreichen der optimalen Wirkkonzentration aber nur wieder schwach verringert und im Gegensatz zum unselektiven Liganden nicht mehr bis auf Basalniveau abfällt. Folglich konnten wir belegen, dass auch durch den Einsatz von hohen Konzentrationen des Antagonisten differenzierungsfördernde Effekte in neuronalen Zellen zu beobachten sind. Darüber hinaus zeigt sich das Wirkungsprofil dieser Liganden über einen großen Konzentrationsbereich hinweg konstant. Im Gegensatz zu allen bisher bekannten Liganden könnten diese Verbindungen daher im therapeutischen Einsatz zu deutlich verbesserten Wirkungsprofilen führen, da sie bei nur geringfügig voneinander abweichenden Konzentrationen keine hohen

Effektschwankungen aufweisen. Es kann demnach festgehalten werden, dass FKBP51 im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal als relevantes Wirkstoffziel in einem neuronalen Zellsystem identifiziert und die Bedeutung selektiver Immunophilin-Liganden dadurch in den Fokus gesetzt werden konnte.

Wie bereits weiter oben beschrieben, interessierte uns zusätzlich der biochemische Zusammenhang des durch hohe Konzentrationen an Glucocorticoiden beobachteten Rückgangs der Neuritenlängen. Eine der formulierten Theorien, die es zu überprüfen galt, war die der Induktion von endogenem FKBP51 im Rahmen eines intrazellulären Rückkopplungsmechanismus, mit dem Ziel, die durch hohe Konzentrationen an Glucocorticoiden ausgelösten Signale zu terminieren. Gegebenenfalls hätte dies eine nahezu komplette Abschaltung der MR- oder GR-Signaltransduktion zur Folge haben können, was wiederum die Differenzierung von Neuronen nachhaltig beeinträchtigt hätte. Um dieser Frage nachzugehen, konnten wir nun die selektiven Antagonisten für FKBP51 einsetzen. Unsere These: Sollte das Protein durch hohe Steroid-Spiegel tatsächlich exprimiert werden und dies wiederum der Grund für den Rückgang der durchschnittlichen Neuritenlängen sein, so müsste eine Blockade des inhibierenden Proteins eine Aufhebung der Differenzierungshemmung zur Folge haben. Wie in Abbildung 38 und Abbildung 41 deutlich zu erkennen ist, war dies der Fall. So ließ sich mit Hilfe dieses Experiments verifizieren, dass es durch den Einsatz des Liganden SG568 zu keinem Rückgang der Neuritenlängen mehr kommt. Desweiteren konnten diese Effekte in einer dosis-abhängigen Beziehung gezeigt werden. Unselektive Liganden hingegen waren nicht in der Lage, einen solchen Effekt auszulösen: FK506 etwa vermag den durch das Steroid ausgelösten Rückgang nicht zu verhindern (Abbildung 40). Eine mögliche Erklärung für das in Abbildung 33 beobachtete Verhalten könnte in der Selektivität des Liganden in unserem System liegen. So wurde bislang bezüglich der Bindungseigenschaften der unselektiven Liganden wie FK506 von humanem FKBP51 ausgegangen. Vergleicht man jedoch die Primärstruktur von FKBP52 und FKBP51 von Mäusen mit der des Menschen, so wird deutlich, dass FKBP52 in beiden Organismen deutlich homologer als FKBP51 ist. Im menschlichen Organismus sind die Unterschiede gerade in der für die Bindung von Liganden relevanten FK1-Domäne deutlich prägnanter. Bezieht man nun die Tatsache mit ein, dass die murine Version von FKBP51 strukturell dem humanem FKBP12, welches wiederum FK506 deutlich potenter zu binden vermag als humanes FKBP51, deutlich ähnlicher ist als dem humanen FKBP51, so kann die Vermutung aufgestellt werden, dass murines FKBP51 FK506 noch stärker bindet als murines FKBP52 [250, 251]. Dadurch könnte die unselektive Bindungsqualität von FK506 in Mäusezellen insoweit aufgehoben sein, als dass FK506 hier etwas besser an FKBP51 als an FKBP52 bindet. Somit ist in niedrigen Konzentrationsbereichen eine Blockade von FKBP51 möglich, während in höheren Konzentrationen allmählich ebenfalls FKBP52 antagonisiert wird. Dies spiegelt sich in dem in Abbildung 33 dargestellten Verhalten wider. Bei Konzentrationen bis 100 nM steigt die Neuritenbildung an, während sie danach, gegebenenfalls durch eine Blockade von FKBP52, wieder

abfällt. Eine endgültige Erklärung für das in Abbildung 38 und Abbildung 40 dargestellte Phänomen, nämlich dass dem durch hohe Konzentrationen an steroidal Agonisten ausgelösten Rückgang der Neuriten nur durch FKBP51-selektive Inhibitoren und nicht durch Verbindungen wie FK506 entgegengewirkt werden kann, vermag diese These noch nicht zu bieten. Vermeer et al. berichteten, dass neben FKBP51 auch andere FKBP unter schwacher SHR-Kontrolle stehen, sodass eine Aktivierung des GRs auch zu einer geringen Induktion unter anderem von FKBP52 führt. Jedoch sind die FKBP-Konzentrationen (FKBP12, FKBP13, FKBP22, FKBP25 und FKBP52) nach Aktivierung des SHRs maximal doppelt so hoch. Mit der starken Induktion von FKBP51 sind sie nicht vergleichbar [84]. Ob die Inhibition dieses induzierten FKBP52 also eine Relevanz zugesprochen werden kann, bleibt fraglich. Denkbar wäre auch, dass das bereits vorhandene Verhältnis von FKBP51 und FKBP52 in der Zelle von zentraler Bedeutung ist und die Aktivität von FKBP52, welches unter anderem für die Translokation des SHRs verantwortlich ist, nicht gestört werden darf [252]. Ebenfalls nicht zu vernachlässigen bleibt in diesem Kontext die Möglichkeit, dass sekundäre, immunmodulatorische Eigenschaften von FK506 mit für das beobachtete Verhalten verantwortlich sein könnten, die nicht von SG537 und SG568 ausgelöst werden. Die vorliegenden Ergebnissen stützen somit die Theorie, dass infolge hoher Glucocorticoid-Spiegel, wie sie beispielsweise in Stresssituationen beziehungsweise während einer Depression zu beobachten sind [8], FKBP51 verstärkt induziert wird und dadurch eine neuronale Adaption nur eingeschränkt stattfinden kann. Diese Fehlfunktion wiederum kann durch die selektive Blockade des Proteins verhindert werden.

Nachdem es uns gelungen war, einen Rückgang der Neuritogenese von N2a-Zellen mit dem Protein FKBP51 zu verknüpfen und dies gleichzeitig auf eine mögliche Beeinflussung des Steroidhaushalts der Zelle respektive auf eine fehlerhafte SHR-Signalweiterleitung zurückzuführen, wandten wir uns der bereits erwähnten Fragestellung zu, ob ein derartiger Mechanismus auch in noch relevanteren Zelltypen anzutreffen ist. Aus diesem Grund stellten wir vergleichbare Nachforschungen an hippocampalen Neuronen, gewonnen aus Mäuseembryonen (E18), an. Schon Bremner et al. zeigten, dass Depressionen zu reduziertem Volumen des Hippocampus führen [94]. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Krankheit zu einer beträchtlichen Veränderung der Expression relevanter Proteine, die für die synaptische Funktion und Struktur verantwortlich sind, führen. Durch den Einsatz von Antidepressiva konnte diesem Effekt entgegengewirkt werden [114]. Daraus lässt sich folgern, dass hohe GC-Spiegel für solch einen Phänotypen mitverantwortlich sein könnten.

Adulte Neurogenese wurde für hippocampale Areale des Gehirns bereits nachgewiesen [96] und Mechanismen, die neurogenetische Prozesse in Verbindung mit der Therapie von Depressionen bringen, diskutiert. Jedoch sind gleichfalls Prozesse beschrieben worden, in denen eine Behandlung mit Antidepressiva eine Beeinflussung der Synaptogenese zur Folge hat und dies zu Besserungen der

pathologischen Zustände führt. Als äußerst vielversprechend können in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der Sousa-Gruppe angesehen werden, die zeigen konnte, dass eine Verbesserung depressiver Symptome durch den Einsatz von Antidepressiva vermutlich nicht (immer) auf der Neurogenese beruhen können, sondern primär von der Remodulierung des neuronalen Schaltkreises abhängen könnte. Diese Erkenntnis fußt auf der Beobachtung, dass besagte Effekte auch unter Einsatz von Zytostatika, welche eine Neurogenese unmöglich machten, eintreten [115]. Müller et al. stellten weiter fest, dass Stress auf der Ebene der Proteinexpression synapsen-relevanter Gene und der Erhaltung beziehungsweise Remodulierung synaptischer Plastizität, eine wichtige Rolle spielt [111]. Zuletzt sei an dieser Stelle auf eine Publikation von Pepin und Brady verwiesen, in der gezeigt wurde, dass der Einsatz von Antidepressiva in primären Zellkulturen zu Veränderungen der mRNA des GRs wie auch des MRs führt [225, 253]. Dies unterstreicht die direkte Verbindung, die zwischen Steroidsignalen und der Wirkungsweise von Antidepressiva zu bestehen scheint.

Um Effekte von FKBP51 in Neuronen des Hippocampus näher zu beleuchten, präparierten wir solche Neuronen aus Embryonen, die 18 Tage alt waren (siehe Kapitel 3.3.3), und transfizierten diese mit genetisch veränderten Adeno-assoziierten Viren, sodass wir entweder eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), FKBP51 oder FKBP51F67V exprimieren konnten. Anschließend wurden die Zellen entweder mit DMSO oder dem SG466, welcher selektiv an die mutierte Variante des Proteins zu binden vermag, behandelt und die Längen der Neuriten nach drei Tagen *in-vitro* (DIV3) gemessen. Hierbei stellten wir fest, dass FKBP51 sowie dessen Punktmutante FKBP51F67V eine deutliche Inhibition der neuronalen Neuritogenese bewirkte (Abbildung 44). Somit gelang es uns, einen wie bereits für N2a-Zellen beschriebenen Mechanismus erfolgreich auf ein noch relevanteres Zellsystem zu übertragen. Zudem waren wir in der Lage, durch selektive Inhibition des Proteins, nämlich der FKBP51F67V-Variante durch Gabe von SG466, einen Rückgang der durch FKBP51 hervorgerufenen Neuritenbildung herbeizuführen. Damit zeigten wir, dass FKBP51 nicht nur in Neuroblastomazellen, sondern auch in primären hippocampalen Zellen einen modulativen Einfluss auf die Differenzierung von Neuronen nimmt und folglich der Schlüssel eines komplexen Regulationssystems der neuronalen Plastizität zu sein scheint. Wie schon weiter oben beschrieben, konnten bereits zahlreiche Assoziationen zwischen der Modellierung neuronaler Plastizität und der Besserung depressiver Symptomatik durch den Einsatz von Antidepressiva identifiziert werden [106]. Bislang fehlt jedoch die detaillierte Beschreibung biochemischer Mechanismen, die derartige Phänotypen exakt erklären. FKBP51 spielt in diesem Zusammenhang eine äußerst wichtige Rolle, da es unter anderem in steroidal signaltransduktionen eine zentrale Regulationsrolle einnimmt. Weiter scheinen selektive Liganden, die FKBP51 jedoch nicht FKBP52 blockieren, imstande zu sein, jene Mechanismen zu inhibieren und dadurch einen positiven Effekt auf die Differenzierung von Neuronen zu auszulösen.

Dies verdeutlicht das Potenzial, dass derartige Verbindungen aller wissenschaftlichen Wahrscheinlichkeit nach im Einsatz gegen Depressionen auszeichnet.

Bislang wurden im Bezug auf Substanzen, die im Falle einer Depression Einfluss auf die neuronale Organisation nehmen, vor allem Glucocorticoide diskutiert. Hierbei untersuchten verschiedene Gruppen vornehmlich Effekte, welche in Verbindung mit der Neurogenese aber auch Apoptose von Neuronen standen. Hierbei unterschieden sich jedoch nicht nur die eigentlichen Versuchskonzepte der Wissenschaftler, sondern vielmehr auch deren Ergebnisse vehement voneinander. So zeichnen sich Glucocorticoide unter anderem durch ihre apoptotische Eigenschaften auf Neuronen in *in-vitro* Zellkulturen aus, die sie offensichtlich anfälliger für oxidativen Stress machen. Besagte Effekte wurden im Rahmen der Forschung bisher spezifisch auf den GR zurückgeführt [254-256]. Vergleicht man diese Daten allerdings mit *in-vivo* gewonnenen Daten, so scheinen Glucocorticoide tatsächlich essenziell für die Existenz von Neuronen innerhalb wichtiger Areale des Gehirns, wie dem Gyrus dentatus, zu sein [257]. Wie konnte es zu diesen widersprüchlichen Aussagen kommen? Eine der Hauptproblematiken stellen hier die voneinander abweichenden Konzentrationen in der Verwendung der entsprechenden Corticoide dar. Zudem erweist sich zumeist die Wahl der Agonisten, aber auch Antagonisten bezüglich ihrer exklusiven Selektivität gegenüber eines SHRs als besonders problematisch – und zwar insbesondere im Kontext des Versuchs, Mechanismen des GRs wie auch des MRs zu entschlüsseln. Diese beiden Rezeptoren neigen aufgrund ihrer hohen Verwandtschaft, dazu, Liganden in ähnlich starker Weise zu binden, was vor allem dann einen signifikanten Einfluss auf die Besetzung beider Rezeptoren bewirkt, wenn besagte Steroide in hoher, unphysiologischer Konzentration eingesetzt werden [22]. So berichteten beispielsweise Crochemore et al., dass GR-Agonisten eine Apoptose auslösen, während MR-Agonisten den durch die GR-Agonisten ausgelösten Effekt zu blockieren vermögen. Anders verhalten sich MR-Antagonisten, die eine durch Dexamethason induzierte Apoptose verstärken [258]. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit, so wird deutlich, dass sowohl die Wahl des Liganden als auch die Konzentration, mit der er eingesetzt wird, maßgeblich den hervorgerufenen Effekt mitbeeinflussen. Es ist daher fraglich, ob nicht-physiologische Konzentrationen eines Steroids und dessen Effekt in *in-vitro* Zellkulturen auch relevant für *in-vivo* Situationen sind.

Neben den bereits beschriebenen Befunden wurden GCs zusätzlich mit sowohl verminderter als auch erhöhter Neurogenese im Hippocampus assoziiert [126, 127]. Gesichert scheint jedoch die Brisanz von Corticosteroid-Rezeptoren bei Depressionen [13]. Hierbei muss auch der Umstand beachtet werden, dass nicht nur endokrine Steroide einen Einfluss auf neuronale Strukturen entfalten können, sondern dass diese Verbindungsklasse auch massiven Einsatz als Antiphlogistika findet und auch auf diese Weise gewichtige Prozesse in Gang setzen kann [259]. Bemerkenswert im Bezug auf die Wirkung von Antidepressiva, die in der Regel über einen relativ langen Zeitraum

angewendet werden müssen, um ihre gewünschten Effekte zu entfalten, sind hierbei Studien von Pepin et al., die eine Verbindung zwischen Antidepressiva und der erhöhten Expression von GR mRNA in primären Neuronen herstellten [225].

Nachdem wir nunmehr aufzeigen konnten, dass Glucocorticoide, wie auch die SHR-regulierenden FKBP5s, das Differenzierungsverhalten von Neuronen beeinflussen, stellt sich in nächster Konsequenz die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus. Dabei wird es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um GRE- oder aber MRE-kontrollierte Gene handeln, welche je nach Aktivität des Rezeptors unterschiedlich stark exprimiert werden und hierdurch modulativ auf die Biologie neuronaler Zellen wirken. Einer der möglichen Kandidaten hierfür ist BDNF. Das Protein wurde bereits mehrfach mit der Pathophysiologie von Depressionen sowie der Wirkung von Antidepressiva in Verbindung gebracht [226, 260]. Entsprechend wurde publiziert, dass sowohl Stress als auch die Gabe von Glucocorticoiden direkten Einfluss auf die mRNA- und Protein-Spiegel von BDNF im Hippocampus nehmen [215, 216] und dass BDNF sowie dessen Rezeptor TrkB die Entwicklung von Synapsen, deren Plastizität und die Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen maßgebend mitbestimmen [129]. Zusätzlich konnte bewiesen werden, dass Antidepressiva in der Lage sind, die Expression von BDNF zu erhöhen [135]. Darüber hinaus zeigten Kino et al., dass sowohl Dexamethason als auch Aldosteron zu einem BDNF-Anstieg in primären Neuronen führen [141]. Überaus brisant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Boyd und Gordon, die feststellten, dass BDNF neurotrophe Effekte auf die axonale Regeneration bewirkt und hierbei ein Wirkungsprofil aufweist, welches dem in dieser Arbeit festgestellten Glockenkurvenverhalten von Steroiden und unselektiven FKBP-Inhibitoren entspricht und somit in direkten Zusammenhang mit dem durch Glucocorticoide vermittelten Mechanismus stehen könnte [261]. Schließlich zeigten Jeanneteau et al., dass sowohl die Manipulation des Glucocorticoidrezeptors als auch die ektopische Variation von BDNF und TrkB direkte Effekte auf die CRH-Spiegel und somit Einfluss auf die HPA-Achse haben [227]. Dieselbe Gruppe bewies, dass Glucocorticoide selbst in der Lage sind, Trk-Rezeptoren zu modulieren, wobei dieser Effekt intakte Glucocorticoidrezeptoren, also genomische Effekte von GCs, voraussetzt [219]. Subsumierend sei daher an dieser Stelle betont, dass sowohl Variationen des BDNF-Gens als auch Polymorphismen von FKBP5 in Assoziation mit der Entwicklung von Depressionen stehen [262] und somit potenzielle Kandidaten für die Behandlung dieser weit verbreiteten Krankheit darstellen.

Neben den Effekten von Corticoiden wurde bereits untersucht, ob die beteiligten Steroidhormonrezeptoren selbst Grund für die Entwicklung von Depressionen sein könnten. Hier wurde vor allem nach Polymorphismen des GRs geforscht, welche möglicherweise mitverursachend für das besagte Krankheitsbild sind. Es konnten bis dato jedoch keine Verbindungen zwischen der Entwicklung einer Depression und funktionell fehlerhaften Rezeptoren identifiziert werden, sodass zum Beispiel die bereits erwähnte Glucocorticoid-Resistenz depressiver Patienten einen anderen

Ursprung haben muss [39, 263]. Allerdings wurden Assoziationen zu einem der wichtigsten Cochaperone steroidaler Rezeptoren, nämlich FKBP51, im Rahmen des MARS-Projektes (*munch-antidepressant-response-signature*) und anderer Studien gefunden [44, 264]. Weiter ist die Erkenntnis gesichert, dass FKBP51 schon in der Kindheit eine wichtige Rolle im Bezug auf die Entwicklung von Traumata spielt [265, 266]. Klengel et al. konnten beweisen, dass bestimmte Polymorphismen des FKBP5-Gens in Kombination mit traumatischen Ereignissen und dadurch ausgelöste epigenetische Änderungen dieses Gens in den frühen Entwicklungsjahren der Kindheit zur späteren Genese psychischer Krankheiten beitragen kann. Diese Änderungen führen zu einer FKBP51-bedingten Glucocorticoid-Resistenz, welche als Auslöser der pathologischen Situation aufgeführt wird. Vergleicht man die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse über die möglichen Effekte von FKBP51 auf das neuronale System mit diesen Ergebnissen, so wird wissenschaftlich nachvollziehbar, dass ein auf neuronale Differenzierung wirkendes inhibitorisches Protein vor allem auch dann pathogene Effekte verursacht, wenn es während der entwicklungs-kritischen Phase der Kindheit fehlerhaft exprimiert wird.

FKBP51 und FKBP52 stießen bisher vor allem durch ihre Funktion als Co-Chaperone von Steroidhormonrezeptoren und ihre damit verbundenen endokrinen Regulationsmöglichkeiten auf wissenschaftliches Interesse. Auch wurde FKBP51 mit verschiedensten psychischen Krankheiten in Verbindung gebracht, jedoch ist bislang ungeklärt, auf welchen biologischen Mechanismen diese Relevanz beruht. So galt es zu Beginn dieser Arbeit herauszufinden, ob und welche Funktionen FKBP51 im Bezug auf neuronale Systeme einnimmt. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob solche Effekte durch das Einsetzen selektiver Inhibitoren aufgehoben werden kann. Hierfür wurde die Morphologie von Neuronen und vor allem deren Responsivität auf FKBP51, seiner Antagonisten wie auch auf Steroide studiert. Infolgedessen konnte nicht nur die herausgehobene Stellung von FKBP51 bestätigt werden, auch dessen Relevanz im Kontext psychischer Krankheiten wie Depressionen ließ sich biologisch erklären. Zudem zeigten Signalweg-Analysen auf, dass steroidale Effekte Einfluss auf das Differenzierungsmuster von Neuronen nehmen und diese Effekte eng mit dem Regulator FKBP51 verbunden sind. Zuletzt wird die Wichtigkeit dieser Befunde dadurch verstärkt, dass die beschriebenen Effekte durch eine FKBP51-selektive Inhibition aufgehoben werden können. Somit konnten wir im Rahmen dieser Arbeit erstmals Effekte, welche selektiv von FKBP51 vermittelt wurden, direkt mit morphologischen Änderungen von Neuronen assoziieren. Dabei grenzten wir die molekular-biologischen Mechanismen des Proteins weitestgehend – wenn auch nicht ausschließlich – auf die direkte Interaktion mit Steroidhormonrezeptoren ein und können hierdurch nun ein mögliches neues Wirkstoffziel für die Behandlung von Depressionen präsentieren. Dies soll jedoch keinesfalls ausschließen, dass neben der Regulation von SHRs weitere Interaktionspartner von FKBP51 eine Rolle in der Entwicklung von Neuronen spielen können. Zudem müssen in künftigen

Untersuchungen zusätzliche genomische Effekte, die durch die Aktivierung dieser oder anderer Transkriptionsfaktoren ausgelöst werden könnten, mit in die Forschung einbezogen werden. Die vorliegende Arbeit legt nahe, dass eine selektive Inhibition von FKBP51 die Plastizität neuronaler Strukturen erhöhen und somit diese neue Art der pharmakologischen Intervention auf eine völlig neue Stufe heben könnte.

6 Literaturverzeichnis

1. Gangl, K. and G. Birkner, *Aktuelle Bevölkerungsbefragung: Ausmaß, Ursachen und Auswirkungen von Stress in Deutschland*. Kundenkompass Bewegung und Gesundheit, 2009: p. 1 - 32.
2. Possemeyer, *Stress – luxusproblem der satten? Oder akutes Volksleiden?* GEO, 2002: p. 148 ff.
3. Burchfield, S.R., *The stress response: a new perspective*. Psychosom Med, 1979. **41**(8): p. 661-72.
4. Levine, S., *Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. Eur J Pharmacol, 2000. **405**(1-3): p. 149-60.
5. Heuser, I. and C.H. Lammers, *Stress and the brain*. Neurobiol Aging, 2003. **24 Suppl 1**: p. S69-76; discussion S81-2.
6. Riad, M., et al., *Steroids*. Curr Opin Crit Care, 2002. **8**(4): p. 281-4.
7. Avishai-Eliner, S., et al., *Down-regulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (mRNA) precedes early-life experience-induced changes in hippocampal glucocorticoid receptor mRNA*. Endocrinology, 2001. **142**(1): p. 89-97.
8. Heuser, I.J., et al., *Pituitary-adrenal-system regulation and psychopathology during amitriptyline treatment in elderly depressed patients and normal comparison subjects*. Am J Psychiatry, 1996. **153**(1): p. 93-9.
9. Checkley, S., *The neuroendocrinology of depression and chronic stress*. Br Med Bull, 1996. **52**(3): p. 597-617.
10. Heuser, I., A. Yassouridis, and F. Holsboer, *The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders*. J Psychiatr Res, 1994. **28**(4): p. 341-56.
11. Holsboer, F., R. Liebl, and E. Hofschuster, *Repeated dexamethasone suppression test during depressive illness. Normalisation of test result compared with clinical improvement*. J Affect Disord, 1982. **4**(2): p. 93-101.
12. Zobel, A.W., et al., *Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression*. Am J Psychiatry, 1999. **156**(6): p. 949-51.
13. Holsboer, F., *The corticosteroid receptor hypothesis of depression*. Neuropsychopharmacology, 2000. **23**(5): p. 477-501.
14. Trapp, T. and F. Holsboer, *Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action*. Trends Pharmacol Sci, 1996. **17**(4): p. 145-9.
15. Beato, M., P. Herrlich, and G. Schutz, *Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot*. Cell, 1995. **83**(6): p. 851-7.
16. Aranda, A. and A. Pascual, *Nuclear hormone receptors and gene expression*. Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1269-304.
17. Darimont, B.D., et al., *Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions*. Genes Dev, 1998. **12**(21): p. 3343-56.
18. Kauppi, B., et al., *The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22748-54.
19. Baumann, H., et al., *Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain*. Biochemistry, 1993. **32**(49): p. 13463-71.

20. Claessens, F. and D.T. Gewirth, *DNA recognition by nuclear receptors*. Essays Biochem, 2004. **40**: p. 59-72.
21. Lavery, D.N. and I.J. McEwan, *Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations*. Biochem J, 2005. **391**(Pt 3): p. 449-64.
22. de Kloet, E.R., M.S. Oitzl, and M. Joels, *Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity*. Cell Mol Neurobiol, 1993. **13**(4): p. 433-55.
23. de Kloet, E.R., *Brain Corticosteroid Receptor Balance and Homeostatic Control*. 1991.
24. Gould, E., C.S. Woolley, and B.S. McEwen, *The hippocampal formation: morphological changes induced by thyroid, gonadal and adrenal hormones*. Psychoneuroendocrinology, 1991. **16**(1-3): p. 67-84.
25. V., C.-P. and K. C., *The Hippocampus: New Vistas (Neurology and Neurobiology)*. 1989.
26. Flood, J.F., G.E. Smith, and E. Roberts, *Dehydroepiandrosterone and its sulfate enhance memory retention in mice*. Brain Res, 1988. **447**(2): p. 269-78.
27. Wang, J.M., et al., *The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression*. J Neurosci, 2005. **25**(19): p. 4706-18.
28. Gago, N., et al., *3alpha,5alpha-Tetrahydroprogesterone (allopregnanolone) and gamma-aminobutyric acid: autocrine/paracrine interactions in the control of neonatal PSA-NCAM+ progenitor proliferation*. J Neurosci Res, 2004. **78**(6): p. 770-83.
29. Joels, M. and E.R. de Kloet, *Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems*. Prog Neurobiol, 1994. **43**(1): p. 1-36.
30. Fang, L., et al., *Unliganded and hormone-bound glucocorticoid receptors interact with distinct hydrophobic sites in the Hsp90 C-terminal domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(49): p. 18487-92.
31. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(2): p. 111-33.
32. Silverstein, A.M., et al., *Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16224-30.
33. Morishima, Y., et al., *Stepwise assembly of a glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex resolves two sequential ATP-dependent events involving first hsp70 and then hsp90 in opening of the steroid binding pocket*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18054-60.
34. Gee, A.C. and J.A. Katzenellenbogen, *Probing conformational changes in the estrogen receptor: evidence for a partially unfolded intermediate facilitating ligand binding and release*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(3): p. 421-8.
35. Scherrer, L.C., et al., *A heat shock protein complex isolated from rabbit reticulocyte lysate can reconstitute a functional glucocorticoid receptor-Hsp90 complex*. Biochemistry, 1992. **31**(32): p. 7325-9.
36. Dittmar, K.D., et al., *The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7358-66.
37. Morishima, Y., et al., *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, 2000. **275**(10): p. 6894-900.
38. Morishima, Y., et al., *The hsp90 cochaperone p23 is the limiting component of the multiprotein hsp90/hsp70-based chaperone system in vivo where it acts to stabilize the client protein: hsp90 complex*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48754-63.
39. Moutsatsou, P., et al., *Glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms are not mutated in bipolar affective disorder*. Mol Psychiatry, 2000. **5**(2): p. 196-202.
40. Webster, M.J., et al., *Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders*. Mol Psychiatry, 2002. **7**(9): p. 985-94, 924.

41. Cox, M.B. and D.F. Smith, *Functions of the Hsp90-Binding FKBP Immunophilins*. Networking of Chaperones by Co-Chaperones, 2006.
42. Cheung-Flynn, J., et al., *Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(6): p. 1654-66.
43. Riggs, D.L., et al., *The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo*. EMBO J, 2003. **22**(5): p. 1158-67.
44. Binder, E.B., et al., *Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment*. Nat Genet, 2004. **36**(12): p. 1319-25.
45. Willour, V.L., et al., *Family-based association of FKBP5 in bipolar disorder*. Mol Psychiatry, 2009. **14**(3): p. 261-8.
46. Schmidt, M.V., et al., *The prospect of FKBP51 as a drug target*. ChemMedChem, 2012. **7**(8): p. 1351-9.
47. Fischer, G., H. Bang, and C. Mech, *[Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]*. Biomed Biochim Acta, 1984. **43**(10): p. 1101-11.
48. Fischer, S., S. Michnick, and M. Karplus, *A mechanism for rotamase catalysis by the FK506 binding protein (FKBP)*. Biochemistry, 1993. **32**(50): p. 13830-7.
49. Lilie, H., et al., *Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro*. Protein Sci, 1993. **2**(9): p. 1490-6.
50. Aghdasi, B., et al., *FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2425-30.
51. Galat, A., *Functional drift of sequence attributes in the FK506-binding proteins (FKBPs)*. J Chem Inf Model, 2008. **48**(5): p. 1118-30.
52. Galat, A., et al., *A rapamycin-selective 25-kDa immunophilin*. Biochemistry, 1992. **31**(8): p. 2427-34.
53. Jarczowski, F., G. Fischer, and F. Edlich, *FKBP36 forms complexes with clathrin and Hsp72 in spermatocytes*. Biochemistry, 2008. **47**(26): p. 6946-52.
54. Jarczowski, F., et al., *FKBP36 is an inherent multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitor*. J Biol Chem, 2009. **284**(2): p. 766-73.
55. Kuzhandaivelu, N., et al., *XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(23): p. 4741-50.
56. Shirane, M. and K.I. Nakayama, *Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(1): p. 28-37.
57. Callebaut, I., et al., *An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6270-4.
58. Cheung, K.L., M. Bates, and V.S. Ananthanarayanan, *Effect of FKBP65, a putative elastin chaperone, on the coacervation of tropoelastin in vitro*. Biochem Cell Biol, 2010. **88**(6): p. 917-25.
59. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. **66**(4): p. 807-15.
60. Liu, J., et al., *Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity*. Biochemistry, 1992. **31**(16): p. 3896-901.
61. Marz, A.M., et al., *Large FK506-Binding Proteins Shape the Pharmacology of Rapamycin*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(7): p. 1357-67.
62. Hui, K.K., et al., *Calcineurin inhibition enhances motor neuron survival following injury*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(3): p. 671-86.
63. Park, K.K., et al., *Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway*. Science, 2008. **322**(5903): p. 963-6.

64. Steiner, J.P., et al., *Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A*. Nat Med, 1997. **3**(4): p. 421-8.
65. Gold, B.G., D.M. Armistead, and M.S. Wang, *Non-FK506-binding protein-12 neuroimmunophilin ligands increase neurite elongation and accelerate nerve regeneration*. J Neurosci Res, 2005. **80**(1): p. 56-65.
66. Kupina, N.C., et al., *Neuroimmunophilin ligand V-10,367 is neuroprotective after 24-hour delayed administration in a mouse model of diffuse traumatic brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2002. **22**(10): p. 1212-21.
67. Costantini, L.C., et al., *Immunophilin ligands can prevent progressive dopaminergic degeneration in animal models of Parkinson's disease*. Eur J Neurosci, 2001. **13**(6): p. 1085-92.
68. Edlich, F., et al., *The specific FKBP38 inhibitor N-(N',N'-dimethylcarboxamidomethyl)cycloheximide has potent neuroprotective and neurotrophic properties in brain ischemia*. J Biol Chem, 2006. **281**(21): p. 14961-70.
69. Yamazaki, S., et al., *FK1706, a novel non-immunosuppressive immunophilin ligand, modifies the course of painful diabetic neuropathy*. Neuropharmacology, 2008. **55**(7): p. 1226-30.
70. Minematsu, T., et al., *Time-dependent inhibitory effects of (1R,9S,12S,13R,14S,17R,18E,21S,23S,24R,25S,27R)-1,14-dihydroxy-12-(E)-2-[(1R,3R,4 R)-4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1-methylvinyl-23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetra methyl-17-(2-oxopropyl)-11,28-dioxo-4-azatricyclo[22.3.1.0(4.9)]octacos-18-ene-2, 3,10,16-tetrone (FK1706), a novel nonimmunosuppressive immunophilin ligand, on CYP3A4/5 activity in humans in vivo and in vitro*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(2): p. 249-59.
71. Gold, B.G., et al., *Immunophilin FK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12) mediates the neurotrophic action of FK506*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(3): p. 1202-10.
72. Smith, D.F., L.E. Faber, and D.O. Toft, *Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(7): p. 3996-4003.
73. Sanchez, E.R., *Hsp56: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes*. J Biol Chem, 1990. **265**(36): p. 22067-70.
74. Pirkel, F. and J. Buchner, *Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40*. J Mol Biol, 2001. **308**(4): p. 795-806.
75. Sinars, C.R., et al., *Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 868-73.
76. Wu, B., et al., *3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8348-53.
77. Silverstein, A.M., et al., *Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 36980-6.
78. Galigniana, M.D., et al., *Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14884-9.
79. Tranguch, S., et al., *Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(40): p. 14326-31.
80. Davies, T.H., Y.M. Ning, and E.R. Sanchez, *A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4597-600.
81. Riggs, D.L., et al., *Noncatalytic role of the FKBP52 peptidyl-prolyl isomerase domain in the regulation of steroid hormone signaling*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(24): p. 8658-69.
82. Denny, W.B., et al., *Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding*. Endocrinology, 2000. **141**(11): p. 4107-13.

83. Scammell, J.G., et al., *Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates*. Gen Comp Endocrinol, 2001. **124**(2): p. 152-65.
84. Vermeer, H., et al., *An in vitro bioassay to determine individual sensitivity to glucocorticoids: induction of FKBP51 mRNA in peripheral blood mononuclear cells*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **218**(1-2): p. 49-55.
85. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones*. Endocr Rev, 1997. **18**(3): p. 306-60.
86. Ni, L., et al., *FKBP51 promotes assembly of the Hsp90 chaperone complex and regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(5): p. 1243-53.
87. Jinwal, U.K., et al., *The Hsp90 cochaperone, FKBP51, increases Tau stability and polymerizes microtubules*. J Neurosci, 2010. **30**(2): p. 591-9.
88. Soontornniyomkij, V., et al., *Short-term recognition memory impairment is associated with decreased expression of FK506 binding protein 51 in the aged mouse brain*. Age (Dordr), 2010. **32**(3): p. 309-22.
89. Touma, C., et al., *FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior*. Biol Psychiatry, 2011. **70**(10): p. 928-36.
90. Hartmann, J., et al., *The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress*. Neuropharmacology, 2012. **62**(1): p. 332-9.
91. Gaali, S., *Design and Synthesis of Selective Ligands for the FK506-binding Protein 51*. Doktorarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München 2012.
92. Monroe, S.M. and A.D. Simons, *Diathesis-stress theories in the context of life stress research: implications for the depressive disorders*. Psychol Bull, 1991. **110**(3): p. 406-25.
93. Li, Y., Y. Mu, and F.H. Gage, *Development of neural circuits in the adult hippocampus*. Curr Top Dev Biol, 2009. **87**: p. 149-74.
94. Bremner, J.D., et al., *Hippocampal volume reduction in major depression*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(1): p. 115-8.
95. Nelson, M.D., et al., *Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study*. Arch Gen Psychiatry, 1998. **55**(5): p. 433-40.
96. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 223-50.
97. Kempermann, G. and F.H. Gage, *Neurogenesis in the adult hippocampus*. Novartis Found Symp, 2000. **231**: p. 220-35; discussion 235-41, 302-6.
98. DeCarolis, N.A. and A.J. Eisch, *Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: a critical evaluation*. Neuropharmacology, 2010. **58**(6): p. 884-93.
99. Dhikav, V. and K.S. Anand, *Is hippocampal atrophy a future drug target?* Med Hypotheses, 2007. **68**(6): p. 1300-6.
100. van Praag, H., G. Kempermann, and F.H. Gage, *Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus*. Nat Neurosci, 1999. **2**(3): p. 266-70.
101. van Praag, H., G. Kempermann, and F.H. Gage, *Neural consequences of environmental enrichment*. Nat Rev Neurosci, 2000. **1**(3): p. 191-8.
102. Mirescu, C. and E. Gould, *Stress and adult neurogenesis*. Hippocampus, 2006. **16**(3): p. 233-8.
103. Berton, O. and E.J. Nestler, *New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(2): p. 137-51.
104. Leyton, M., et al., *Depressive relapse following acute tryptophan depletion in patients with major depressive disorder*. J Psychopharmacol, 2000. **14**(3): p. 284-7.
105. Miller, H.L., et al., *Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression*. Arch Gen Psychiatry, 1996. **53**(2): p. 117-28.
106. Bambico, F.R. and C. Belzung, *Novel Insights into Depression and Antidepressants: A Synergy Between Synaptogenesis and Neurogenesis?* Curr Top Behav Neurosci, 2012.

107. Boldrini, M., et al., *Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus*. Neuropsychopharmacology, 2009. **34**(11): p. 2376-89.
108. Huttenlocher, P.R., *Morphometric study of human cerebral cortex development*. Neuropsychologia, 1990. **28**(6): p. 517-27.
109. Grutzendler, J., N. Kasthuri, and W.B. Gan, *Long-term dendritic spine stability in the adult cortex*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 812-6.
110. Bhatt, D.H., S. Zhang, and W.B. Gan, *Dendritic spine dynamics*. Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 261-82.
111. Muller, H.K., et al., *Differential expression of synaptic proteins after chronic restraint stress in rat prefrontal cortex and hippocampus*. Brain Res, 2011. **1385**: p. 26-37.
112. Deschwanden, A., et al., *Reduced metabotropic glutamate receptor 5 density in major depression determined by [(11)C]ABP688 PET and postmortem study*. Am J Psychiatry, 2011. **168**(7): p. 727-34.
113. Feyissa, A.M., et al., *Elevated level of metabotropic glutamate receptor 2/3 in the prefrontal cortex in major depression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010. **34**(2): p. 279-83.
114. Duric, V., et al., *Altered expression of synapse and glutamate related genes in post-mortem hippocampus of depressed subjects*. Int J Neuropsychopharmacol, 2013. **16**(1): p. 69-82.
115. Bessa, J.M., et al., *The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling*. Mol Psychiatry, 2009. **14**(8): p. 764-73, 739.
116. Charalampopoulos, I., et al., *Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival*. Trends Endocrinol Metab, 2008. **19**(8): p. 300-7.
117. Compagnone, N.A. and S.H. Mellon, *Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4678-83.
118. MacLusky, N.J., T. Hajszan, and C. Leranth, *Effects of dehydroepiandrosterone and flutamide on hippocampal CA1 spine synapse density in male and female rats: implications for the role of androgens in maintenance of hippocampal structure*. Endocrinology, 2004. **145**(9): p. 4154-61.
119. Schumacher, M., et al., *Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination*. Growth Horm IGF Res, 2004. **14 Suppl A**: p. S18-33.
120. Ghomari, A.M., E.E. Baulieu, and M. Schumacher, *Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures*. Neuroscience, 2005. **135**(1): p. 47-58.
121. Gonzalez Deniselle, M.C., et al., *Progesterone modulates brain-derived neurotrophic factor and choline acetyltransferase in degenerating Wobbler motoneurons*. Exp Neurol, 2007. **203**(2): p. 406-14.
122. Charalampopoulos, I., et al., *Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1088**: p. 139-52.
123. Karishma, K.K. and J. Herbert, *Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(3): p. 445-53.
124. Liston, C. and W.B. Gan, *Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(38): p. 16074-9.
125. Haynes, L.E., D. Barber, and I.J. Mitchell, *Chronic antidepressant medication attenuates dexamethasone-induced neuronal death and sublethal neuronal damage in the hippocampus and striatum*. Brain Res, 2004. **1026**(2): p. 157-67.
126. Schoenfeld, T.J. and E. Gould, *Stress, stress hormones, and adult neurogenesis*. Exp Neurol, 2012. **233**(1): p. 12-21.
127. Sapolsky, R.M., et al., *Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates*. J Neurosci, 1990. **10**(9): p. 2897-902.

128. Cameron, H.A. and E. Gould, *Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus*. Neuroscience, 1994. **61**(2): p. 203-9.
129. Yoshii, A. and M. Constantine-Paton, *Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease*. Dev Neurobiol, 2010. **70**(5): p. 304-22.
130. Chao, M.V., *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(4): p. 299-309.
131. Reichardt, L.F., *Neurotrophin-regulated signalling pathways*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1473): p. 1545-64.
132. Kuczewski, N., et al., *Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences*. Mol Neurobiol, 2009. **39**(1): p. 37-49.
133. Suri, D. and V.A. Vaidya, *Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: Relevance to hippocampal structural and functional plasticity*. Neuroscience, 2012.
134. Tsankova, N.M., et al., *Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action*. Nat Neurosci, 2006. **9**(4): p. 519-25.
135. Zhang, Y., et al., *Chronic antidepressant administration alleviates frontal and hippocampal BDNF deficits in CUMS rat*. Brain Res, 2010. **1366**: p. 141-8.
136. Barbany, G. and H. Persson, *Regulation of Neurotrophin mRNA Expression in the Rat Brain by Glucocorticoids*. Eur J Neurosci, 1992. **4**(5): p. 396-403.
137. Gourley, S.L., et al., *A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF*. Neuropsychopharmacology, 2009. **34**(3): p. 707-16.
138. Shah, O.J., S.R. Kimball, and L.S. Jefferson, *Among translational effectors, p70S6k is uniquely sensitive to inhibition by glucocorticoids*. Biochem J, 2000. **347**(Pt 2): p. 389-97.
139. John, C.D., et al., *Time-specific effects of perinatal glucocorticoid treatment on anterior pituitary morphology, annexin 1 expression and adrenocorticotrophic hormone secretion in the adult female rat*. J Neuroendocrinol, 2006. **18**(12): p. 949-59.
140. McArthur, S., et al., *Annexin A1 regulates hormone exocytosis through a mechanism involving actin reorganization*. FASEB J, 2009. **23**(11): p. 4000-10.
141. Kino, T., et al., *Cyclin-dependent kinase 5 modulates the transcriptional activity of the mineralocorticoid receptor and regulates expression of brain-derived neurotrophic factor*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(5): p. 941-52.
142. Ridder, S., et al., *Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions*. J Neurosci, 2005. **25**(26): p. 6243-50.
143. Schulte-Herbruggen, O., et al., *Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function*. Psychoneuroendocrinology, 2006. **31**(10): p. 1266-77.
144. Castleberry, R.P., *Neuroblastoma*. Eur J Cancer, 1997. **33**(9): p. 1430-7; discussion 1437-8.
145. Biedler, J.L., L. Helson, and B.A. Spengler, *Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture*. Cancer Res, 1973. **33**(11): p. 2643-52.
146. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
147. Shastry, P., A. Basu, and M.S. Rajadhyaksha, *Neuroblastoma cell lines--a versatile in vitro model in neurobiology*. Int J Neurosci, 2001. **108**(1-2): p. 109-26.
148. Veronesi, B. and M. Ehrlich, *Cell culture models of Environmental Chemical Neurotoxicity*. Neurotoxicity In Vitro, 1999: p. 241 -268.
149. Willets, J.M., D.G. Lambert, and H.R. Griffiths, *Suitability of B65 and SH-SY5Y neuroblastoma cells as models for 'in vitro' neurotoxicity testing*. Biochem Soc Trans, 1993. **21**(4): p. 452S.
150. Claudio, L., *An analysis of the U.S. Environmental Protection Agency neurotoxicity testing guidelines*. Regul Toxicol Pharmacol, 1992. **16**(2): p. 202-12.
151. Hardwick, J.M., *Viral interference with apoptosis*. Semin Cell Dev Biol, 1998. **9**(3): p. 339-49.

152. Grandgirard, D., et al., *Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2*. EMBO J, 1998. **17**(5): p. 1268-78.
153. Prasad, K.N., *Differentiation of neuroblastoma cells: a useful model for neurobiology and cancer*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1991. **66**(4): p. 431-51.
154. Brittain, D.E., et al., *Total synthesis of antascomicin B*. Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(18): p. 2732-7.
155. Kozany, C., et al., *Fluorescent probes to characterise FK506-binding proteins*. Chembiochem, 2009. **10**(8): p. 1402-10.
156. Gopalakrishnan, R., et al., *Exploration of pipercolate sulfonamides as binders of the FK506-binding proteins 51 and 52*. J Med Chem, 2012. **55**(9): p. 4123-31.
157. Gopalakrishnan, R., et al., *Evaluation of synthetic FK506 analogues as ligands for the FK506-binding proteins 51 and 52*. J Med Chem, 2012. **55**(9): p. 4114-22.
158. Quinta, H.R., et al., *Subcellular rearrangement of hsp90-binding immunophilins accompanies neuronal differentiation and neurite outgrowth*. J Neurochem, 2010. **115**(3): p. 716-34.
159. Denny, W.B., et al., *Structure-function analysis of squirrel monkey FK506-binding protein 51, a potent inhibitor of glucocorticoid receptor activity*. Endocrinology, 2005. **146**(7): p. 3194-201.
160. Chrousos, G.P., et al., *Glucocorticoid hormone resistance during primate evolution: receptor-mediated mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 2036-40.
161. Wochnik, G.M., et al., *FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4609-16.
162. Barent, R.L., et al., *Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(3): p. 342-54.
163. Russell, L.C., et al., *Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20060-3.
164. Gaali, S., et al., *The chemical biology of immunophilin ligands*. Curr Med Chem, 2011. **18**(35): p. 5355-79.
165. Price, R.D., et al., *FK1706, a novel non-immunosuppressive immunophilin: neurotrophic activity and mechanism of action*. Eur J Pharmacol, 2005. **509**(1): p. 11-9.
166. Davies, T.H., Y.M. Ning, and E.R. Sanchez, *Differential control of glucocorticoid receptor hormone-binding function by tetratricopeptide repeat (TPR) proteins and the immunosuppressive ligand FK506*. Biochemistry, 2005. **44**(6): p. 2030-8.
167. Attwood, B.K., et al., *Neurospine cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 372-5.
168. O'Leary, J.C., 3rd, et al., *A new anti-depressive strategy for the elderly: ablation of FKBP5/FKBP51*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24840.
169. Bishop, A.C., et al., *A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase*. Nature, 2000. **407**(6802): p. 395-401.
170. Gallo, L.I., et al., *Differential recruitment of tetratricopeptide repeat domain immunophilins to the mineralocorticoid receptor influences both heat-shock protein 90-dependent retrotransport and hormone-dependent transcriptional activity*. Biochemistry, 2007. **46**(49): p. 14044-57.
171. Periyasamy, S., et al., *FKBP51 and Cyp40 are positive regulators of androgen-dependent prostate cancer cell growth and the targets of FK506 and cyclosporin A*. Oncogene, 2010. **29**(11): p. 1691-701.
172. Jaaskelainen, T., H. Makkonen, and J.J. Palvimo, *Steroid up-regulation of FKBP51 and its role in hormone signaling*. Curr Opin Pharmacol, 2011. **11**(4): p. 326-31.
173. Ulrich-Lai, Y.M. and J.P. Herman, *Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(6): p. 397-409.

174. De Kloet, E.R., et al., *Brain corticosteroid receptor balance in health and disease*. *Endocr Rev*, 1998. **19**(3): p. 269-301.
175. Riether, D., et al., *Nonsteroidal dissociated glucocorticoid agonists containing azaindoles as steroid A-ring mimetics*. *J Med Chem*, 2010. **53**(18): p. 6681-98.
176. Sullivan, W.P., B.A. Owen, and D.O. Toft, *The influence of ATP and p23 on the conformation of hsp90*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(48): p. 45942-8.
177. Sullivan, W., et al., *Nucleotides and two functional states of hsp90*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(12): p. 8007-12.
178. Lee, M.O., et al., *Radical represses the transcriptional function of the estrogen receptor by suppressing the stabilization of the receptor by heat shock protein 90*. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. **188**(1-2): p. 47-54.
179. Wang, Y., et al., *Increasing the Efficiency of Ligands for FK506-Binding Protein 51 by Conformational Control*. *J Med Chem*, 2013. **56**(10): p. 3922-3935.
180. Kino, T., et al., *FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1987. **40**(9): p. 1249-55.
181. Harrison, D.E., et al., *Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice*. *Nature*, 2009. **460**(7253): p. 392-5.
182. Caccamo, A., et al., *Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(17): p. 13107-20.
183. Malagelada, C., et al., *Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease*. *J Neurosci*, 2010. **30**(3): p. 1166-75.
184. Gold, B.G., K. Katoh, and T. Storm-Dickerson, *The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve*. *J Neurosci*, 1995. **15**(11): p. 7509-16.
185. David, D.J., et al., *Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression*. *Neuron*, 2009. **62**(4): p. 479-93.
186. Santarelli, L., et al., *Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants*. *Science*, 2003. **301**(5634): p. 805-9.
187. Conti, A.M., S.J. Fischer, and A.J. Windebank, *Inhibition of axonal growth from sensory neurons by excess nerve growth factor*. *Ann Neurol*, 1997. **42**(6): p. 838-46.
188. Strand, F.L., et al., *ACTH modulation of nerve development and regeneration*. *Prog Neurobiol*, 1989. **33**(1): p. 45-85.
189. Calabrese, E.J., *Enhancing and regulating neurite outgrowth*. *Crit Rev Toxicol*, 2008. **38**(4): p. 391-418.
190. Snyder, S.H., et al., *Neural actions of immunophilin ligands*. *Trends Pharmacol Sci*, 1998. **19**(1): p. 21-6.
191. Hamilton, G.S., et al., *FKBP12-binding domain analogues of FK506 are potent, nonimmunosuppressive neurotrophic agents in vitro and promote recovery in a mouse model of Parkinson's disease*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 1997 **7**(13): p. 1785-1790.
192. Fava, M. and K.S. Kendler, *Major depressive disorder*. *Neuron*, 2000. **28**(2): p. 335-41.
193. Sachar, E.J., et al., *Disrupted 24-hour patterns of cortisol secretion in psychotic depression*. *Arch Gen Psychiatry*, 1973. **28**(1): p. 19-24.
194. Carroll, B.J., *Use of the dexamethasone suppression test in depression*. *J Clin Psychiatry*, 1982. **43**(11 Pt 2): p. 44-50.
195. McEwen, B.S., *Mood disorders and allostatic load*. *Biol Psychiatry*, 2003. **54**(3): p. 200-7.
196. Herpfer, I., et al., *Early life stress differentially modulates distinct forms of brain plasticity in young and adult mice*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46004.
197. Gould, E., et al., *Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood*. *Biol Psychiatry*, 2000. **48**(8): p. 715-20.

198. Malberg, J.E., et al., *Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus*. J Neurosci, 2000. **20**(24): p. 9104-10.
199. McEwen, B.S. and A.M. Magarinos, *Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders*. Hum Psychopharmacol, 2001. **16**(S1): p. S7-S19.
200. McKittrick, C.R., et al., *Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites*. Synapse, 2000. **36**(2): p. 85-94.
201. Arriza, J.L., et al., *Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor*. Science, 1987. **237**(4812): p. 268-75.
202. Rogerson, F.M., et al., *Structural determinants of aldosterone binding selectivity in the mineralocorticoid receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36305-11.
203. Wilkinson, J.M., et al., *Compound profiling using a panel of steroid hormone receptor cell-based assays*. J Biomol Screen, 2008. **13**(8): p. 755-65.
204. Simmons, P.S., et al., *Increased proteolysis. An effect of increases in plasma cortisol within the physiologic range*. J Clin Invest, 1984. **73**(2): p. 412-20.
205. Droste, S.K., et al., *Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress*. Endocrinology, 2008. **149**(7): p. 3244-53.
206. Gomez-Sanchez, C.E. and E.P. Gomez-Sanchez, *RU-26988--a new tool for the study of the mineralocorticoid receptor*. Endocrinology, 1983. **113**(3): p. 1004-9.
207. Kim, P.J., et al., *Evaluation of RU28318 and RU40555 as selective mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor antagonists, respectively: receptor measures and functional studies*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. **67**(3): p. 213-22.
208. Belanoff, J.K., et al., *Selective glucocorticoid receptor (type II) antagonist prevents and reverses olanzapine-induced weight gain*. Diabetes Obes Metab, 2010. **12**(6): p. 545-7.
209. Zalachoras, I., et al., *Differential targeting of brain stress circuits with a selective glucocorticoid receptor modulator*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(19): p. 7910-5.
210. Schacke, H., W.D. Docke, and K. Asadullah, *Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids*. Pharmacol Ther, 2002. **96**(1): p. 23-43.
211. Anacker, C., et al., *Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(5): p. 872-83.
212. Resche-Rigon, M. and H. Gronemeyer, *Therapeutic potential of selective modulators of nuclear receptor action*. Curr Opin Chem Biol, 1998. **2**(4): p. 501-7.
213. Huang, C.C., et al., *Effects of neonatal corticosteroid treatment on hippocampal synaptic function*. Pediatr Res, 2007. **62**(3): p. 267-70.
214. Atkins, C.M., et al., *Bidirectional regulation of cytoplasmic polyadenylation element-binding protein phosphorylation by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein phosphatase 1 during hippocampal long-term potentiation*. J Neurosci, 2005. **25**(23): p. 5604-10.
215. Roskoden, T., U. Otten, and H. Schwegler, *Early postnatal corticosterone administration regulates neurotrophins and their receptors in septum and hippocampus of the rat*. Exp Brain Res, 2004. **154**(2): p. 183-91.
216. Smith, M.A., et al., *Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus*. J Neurosci, 1995. **15**(3 Pt 1): p. 1768-77.
217. Numakawa, T., et al., *Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNF-triggered PLC-gamma signaling for glutamate release via a glutamate transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(2): p. 647-52.
218. Kumamaru, E., et al., *Glucocorticoid suppresses BDNF-stimulated MAPK/ERK pathway via inhibiting interaction of Shp2 with TrkB*. FEBS Lett, 2011. **585**(20): p. 3224-8.
219. Jeanneteau, F., M.J. Garabedian, and M.V. Chao, *Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(12): p. 4862-7.

220. Di, S., et al., *Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons*. *Endocrinology*, 2005. **146**(10): p. 4292-301.
221. Di, S., et al., *Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways*. *J Neurosci*, 2009. **29**(2): p. 393-401.
222. Hu, W., et al., *Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network*. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(8): p. 1693-707.
223. Takahashi, T., et al., *Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons*. *J Neurochem*, 2002. **83**(6): p. 1441-51.
224. Yang, Y.C., C.H. Lin, and E.H. Lee, *Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) increases neurite formation through microtubule depolymerization by SGK1 and by SGK1 phosphorylation of tau*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(22): p. 8357-70.
225. Pepin, M.C., S. Beaulieu, and N. Barden, *Antidepressants regulate glucocorticoid receptor messenger RNA concentrations in primary neuronal cultures*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1989. **6**(1): p. 77-83.
226. Altar, C.A., *Neurotrophins and depression*. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. **20**(2): p. 59-61.
227. Jeanneteau, F.D., et al., *BDNF and glucocorticoids regulate corticotrophin-releasing hormone (CRH) homeostasis in the hypothalamus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(4): p. 1305-10.
228. Westberry, J.M., et al., *Glucocorticoid resistance in squirrel monkeys results from a combination of a transcriptionally incompetent glucocorticoid receptor and overexpression of the glucocorticoid receptor co-chaperone FKBP51*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006. **100**(1-3): p. 34-41.
229. Shim, S., et al., *Peptidyl-prolyl isomerase FKBP52 controls chemotropic guidance of neuronal growth cones via regulation of TRPC1 channel opening*. *Neuron*, 2009. **64**(4): p. 471-83.
230. Cioffi, D.L., T.R. Hubler, and J.G. Scammell, *Organization and function of the FKBP52 and FKBP51 genes*. *Curr Opin Pharmacol*, 2011. **11**(4): p. 308-13.
231. Kadeba, P.I., et al., *Regulation of store-operated calcium entry by FK506-binding immunophilins*. *Cell Calcium*, 2013. **53**(4): p. 275-85.
232. Sinkins, W.G., et al., *Association of immunophilins with mammalian TRPC channels*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(33): p. 34521-9.
233. Pei, H., et al., *FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt*. *Cancer Cell*, 2009. **16**(3): p. 259-66.
234. Fabian, A.K., et al., *InterAKTions with FKBP5 - Mutational and Pharmacological Exploration*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e57508.
235. Jiang, W., et al., *FK506 binding protein mediates glioma cell growth and sensitivity to rapamycin treatment by regulating NF-kappaB signaling pathway*. *Neoplasia*, 2008. **10**(3): p. 235-43.
236. Romano, M.F., et al., *Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF-kappaB/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(18): p. 2829-36.
237. Romano, S., et al., *Role of FK506-binding protein 51 in the control of apoptosis of irradiated melanoma cells*. *Cell Death Differ*, 2010. **17**(1): p. 145-57.
238. De Bosscher, K., W. Vanden Berghe, and G. Haegeman, *Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB*. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6868-86.
239. Kolla, V., N.M. Robertson, and G. Litwack, *Identification of a mineralocorticoid/glucocorticoid response element in the human Na/K ATPase alpha1 gene promoter*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **266**(1): p. 5-14.
240. Africander, D., R. Louw, and J.P. Hapgood, *Investigating the anti-mineralocorticoid properties of synthetic progestins used in hormone therapy*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **433**(3): p. 305-10.

241. Shang, Y., et al., *Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription*. Cell, 2000. **103**(6): p. 843-52.
242. Gronemeyer, H., J.A. Gustafsson, and V. Laudet, *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(11): p. 950-64.
243. Ou, X.M., et al., *Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 14299-307.
244. Gerard, M., et al., *Unraveling the role of peptidyl-prolyl isomerases in neurodegeneration*. Mol Neurobiol, 2011. **44**(1): p. 13-27.
245. Calabrese, E.J., *Dose-response features of neuroprotective agents: an integrative summary*. Crit Rev Toxicol, 2008. **38**(4): p. 253-348.
246. Park, C.R., et al., *Permissive influence of stress in the expression of a U-shaped relationship between serum corticosterone levels and spatial memory errors in rats*. Dose Response, 2006. **4**(1): p. 55-74.
247. Costantini, L.C. and O. Isacson, *Immunophilin ligands and GDNF enhance neurite branching or elongation from developing dopamine neurons in culture*. Exp Neurol, 2000. **164**(1): p. 60-70.
248. Takebayashi, M., T. Hayashi, and T.P. Su, *Nerve growth factor-induced neurite sprouting in PC12 cells involves sigma-1 receptors: implications for antidepressants*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(3): p. 1227-37.
249. Gold, B.G., *FK506 and the role of the immunophilin FKBP-52 in nerve regeneration*. Drug Metab Rev, 1999. **31**(3): p. 649-63.
250. Bracher, A., et al., *Structural characterization of the PPIase domain of FKBP51, a cochaperone of human Hsp90*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2011. **67**(Pt 6): p. 549-59.
251. Wilson, K.P., et al., *Comparative X-ray structures of the major binding protein for the immunosuppressant FK506 (tacrolimus) in unliganded form and in complex with FK506 and rapamycin*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1995. **51**(Pt 4): p. 511-21.
252. Galigniana, M.D., et al., *The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(5): p. 1285-98.
253. esBrady, L.S., et al., *Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. Therapeutic implications*. J Clin Invest, 1991. **87**(3): p. 831-7.
254. Behl, C., et al., *Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro*. Endocrinology, 1997. **138**(1): p. 101-6.
255. Sotiropoulos, I., et al., *Glucocorticoids trigger Alzheimer disease-like pathobiochemistry in rat neuronal cells expressing human tau*. J Neurochem, 2008. **107**(2): p. 385-97.
256. Yu, S., et al., *Depletion of the neural precursor cell pool by glucocorticoids*. Ann Neurol, 2010. **67**(1): p. 21-30.
257. Gould, E., C.S. Woolley, and B.S. McEwen, *Short-term glucocorticoid manipulations affect neuronal morphology and survival in the adult dentate gyrus*. Neuroscience, 1990. **37**(2): p. 367-75.
258. Crochemore, C., et al., *Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation*. Mol Psychiatry, 2005. **10**(8): p. 790-8.
259. Barnes, P.J., *Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms*. Clin Sci (Lond), 1998. **94**(6): p. 557-72.
260. Martinowich, K., H. Manji, and B. Lu, *New insights into BDNF function in depression and anxiety*. Nat Neurosci, 2007. **10**(9): p. 1089-93.
261. Boyd, J.G. and T. Gordon, *A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor*. Eur J Neurosci, 2002. **15**(4): p. 613-26.
262. Lavebratt, C., et al., *Variations in FKBP5 and BDNF genes are suggestively associated with depression in a Swedish population-based cohort*. J Affect Disord, 2010. **125**(1-3): p. 249-55.

263. Koper, J.W., et al., *Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance*. Hum Genet, 1997. **99**(5): p. 663-8.
264. Hennings, J.M., et al., *Clinical characteristics and treatment outcome in a representative sample of depressed inpatients - findings from the Munich Antidepressant Response Signature (MARS) project*. J Psychiatr Res, 2009. **43**(3): p. 215-29.
265. Collip, D., et al., *FKBP5 as a possible moderator of the psychosis-inducing effects of childhood trauma*. Br J Psychiatry, 2013. **202**: p. 261-8.
266. Klengel, T., et al., *Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions*. Nat Neurosci, 2013. **16**(1): p. 33-41.