

Der Wirkungsmechanismus von Neurosteroiden auf das Cytoskelett neuronaler Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Susanne Lemcke

geb. in White Plains/New York; USA

Mainz, 2008

Die Wahrheit ist für Gott, uns bleibt das Forschen.

J. von Müller

	Vorwort	VI
1	Einleitung	
1.1	Das neuronale Cytoskelett	1
1.1.1	Cytoskelett-Komponenten	2
1.1.2	Myosin II in nicht-Muskel Zellen	8
1.1.2.1	Neuronale Myosine	9
1.1.2.2	Regulation von Myosin II	10
1.2	Rho-GTPasen	11
1.2.1	Regulation der neuronalen Morphogenese durch Rho-GTPasen	12
1.2.1.1	Rac-Effektoren der Aktin-Reorganisation	12
1.2.1.2	Cdc42-Effektoren der Aktin-Reorganisation	13
1.2.1.3	Gemeinsame Effektoren von Rac und Cdc42	13
1.2.2	Rho induzierte Aktin-Reorganisation und Myosin II-Aktivierung	14
1.2.2.1	Regulation der Phosphorylierung der MRLC in neuronalen Zellen durch RhoA und RhoB	15
1.2.3	Regulation der Mikrotubuli durch Rho-GTPasen in nicht-neuronalen und neuronalen Zellen	16
1.3	Neurosteroide	17
1.3.1	Biosynthese von Neurosteroiden	17
1.3.2	Aromatase P450 (P450aro)	18
1.3.3	5 α -Reduktase	18
1.3.4	Funktion von Neurosteroiden	21
1.3.5	DHEA (Dehydroepiandrosteron)	22
1.3.5.1	Intrazelluläre DHEA-Rezeptoren	23
1.3.5.2	Plasmamembran-Rezeptoren für DHEA	24
1.3.5.3	Bindung von DHEA(S) an andere Steroidhormon-Rezeptoren	26
1.3.5.4	DHEA(S)-Bindung im Gehirn	26
1.3.5.5	Physiologische und pharmakologische Konzentrationen von DHEA	28
1.3.6	Testosteron	28
1.3.6.1	Nicht-genomische Effekte über den intrazellulären Androgen-Rezeptor	29
1.3.6.2	Membran-Androgen-Rezeptoren	30
1.3.6.3	Testosteron induziertes Neuriten-Wachstum	31
1.4	Ziele der Arbeit	32
2	Material und Methoden	
2.1	Laborgeräte	34
2.1.1	Chemikalien	35
2.1.2	Antikörper	37
2.1.2.1	Primärantikörper	37
2.1.2.2	Sekundärantikörper	37
2.1.3	Zellkulturmedien und Zusätze	38
2.1.4	Häufig verwendete Puffer, Stammlösungen und Zellkulturmedien	38

Inhaltsverzeichnis

2.1.5.1	Puffer	38
2.1.5.2	Stammlösungen	39
2.1.5.3	Zellkulturmedien	40
2.1.5.4	Medien für die Bakterienkultur	40
2.1.6	Inhibitoren und Aktivatoren	41
2.1.7	Enzyme und Kit-Systeme	41
2.1.8	Steroide	42
2.1.9	Zelllinien	42
2.1.10	Bakterienstämme	43
2.2	Allgemeine Methoden	43
2.2.1	Protein-Fällung (Chloroform/Methanol-Fällung)	43
2.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford	43
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.2.4	Western-Blotting	45
2.2.5	Lipidextraktion	46
2.2.6	Dünnschichtchromatographie	46
2.2.6.1	Beschichten von Kieselgelplatten mit Silbernitrat	47
2.2.6.2	Auftrennung von Steroiden mittels AgNO ₃ beschichteter Kieselgelplatten	47
2.2.7	Luciferase-Assay	48
2.2.7.1	Dual-Luciferase-Test	48
2.2.7.2	Messung der Dual-Luciferase-Aktivität an transient transfizierten Zellen	49
2.3	Molekularbiologische Methoden	50
2.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	50
2.3.2	Lagerung von <i>E. coli</i>	50
2.3.3	Transformation	50
2.3.3.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	50
2.3.4	Endotoxinfreie Plasmidpräparation	51
2.3.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren	51
2.3.6	Elektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nukleinsäuren	52
2.3.7	Restriktionshydrolyse	52
2.4	Zellkultur	53
2.4.1	Allgemeine Arbeitsbedingungen in der Zellkultur	53
2.4.2	Kulturbedingungen	53
2.4.2.1	Kulturbedingungen für SH-SY5Y Neuroblastomazellen	53
2.4.2.2	Differenzierung von SH-SY5Y Neuroblastomazellen mit Retinolsäure in der Zellkultur	53
2.4.2.2.1	Differenzierungs-Protokolle	53
2.4.2.3	Kulturbedingungen für SK-ER α	54
2.4.2.4	Kulturbedingungen für PC12/Vorbereitung auf Apoptose-Assay	54
2.4.3	Transiente Transfektion von SK-ER α	55
2.4.3.1	Stimulation und Lyse der transfizierten Zellen	55

2.4.4	Zellpassage	55
2.4.5	Kryokonservierung	56
2.5	Herstellung der Steroid-Stammlösungen	56
2.5.1	Steroidbehandlung der Zellen	57
2.6	Immunfluoreszenzfärbung neuronaler Zellen	57
2.6.1	Färbung der Mitochondrien	57
2.7	Mikroskopie	58
2.7.1	Mikroskopie an fixierten Zellen	58
2.8	Spezielle Methoden	58
2.8.1	Apoptose-Assay (APOPercentage™ Assay)	58
2.8.2	Fraktionierung von Proteinen mittels ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit	60
2.8.3	Immunpräzipitierung der leichten Ketten des Myosins (MLC) aus dem Zelllysate von SH-SY5Y-Zellen zum Nachweis phosphorylierter MLC (p-MLC) im Western-Blot	61
2.8.3.1	Äquilibrieren der Sepharose	62
2.8.3.2	Klären der Proben	62
2.8.3.3	Antikörperinkubation und Präzipitierung an Sepharose	62
2.8.3.4	Schägger-Gel	62
2.8.3.5	Nachweis von an Ser19 phosphorylierter MRLC	64
2.8.3.6	Nachweis der totalen MLCs	64
2.8.3.7	„Cross-Linking“ von Proteinen	64
2.9	Fluoreszenzmarkierung von Steroidhormonen	65
2.9.1	Aktivierung der an das Steroid gekoppelten Carbonsäuregruppe	65
2.9.1.1	Herstellung des aktivierenden „F-Komplexes“ (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide-Pentafluorphenol)	65
2.9.2	Darstellung des DHEA-Bodipy-Pseudopeptids	65
2.9.2.1	Durchführung des Komplex-F-Verfahrens	65
2.9.3	Darstellung des Testosteron-Bodipy-Pseudopeptids	67
2.9.3.1	Durchführung des Komplex-F-Verfahrens	67
3	Ergebnisse	
3.1	Eindeutige Zuweisung eines Effektes zu einem Steroid durch den Einsatz von Inhibitoren der Steroidsynthese	69
3.1.1	Inhibierung der P450 Aromatase durch Formestan in SH-SY5Y Neuroblastomazellen	70
3.1.2	Inhibierung der 5 α -Reduktase I durch Finasterid in SH-SY5Y Neuroblastomazellen	78
3.1.3	Inhibierung der Hydroxysteroid-Sulfotransferase (ST2A3) durch S-(-)-1-Naphthyl-1-Ethanol in SH-SY5Y Neuroblastomazellen	81
3.2	Untersuchung des Metabolismus von Formestan mittels Dünnschichtchromatographie	88
3.3	Ermittlung der geeigneten Konzentrationen von DHEA und Testosteron im physiologischen Bereich	93
3.4	Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf das Aktinskelett und die Beteiligung des Rho/Rac/Cdc42-Signalwegs	95

Inhaltsverzeichnis

3.4.1	Induktion von Stressfasern	96
3.4.1.1	Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Bildung von Stressfasern	96
3.4.1.2	Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Bildung zentraler und peripherer Stressfasern	98
3.4.1.3	Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Bildung von Stressfasern in Abhängigkeit des Rho-Aktivators LPA und dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632	99
3.4.1.4	Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Bildung von Stressfasern in Abhängigkeit des Rac-Aktivators Bradykinin	101
3.4.1.5	Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Bildung von Stressfasern in Abhängigkeit des PKA- und Rho-Kinase Inhibitors H89	102
3.4.2	Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Induktion von fokalen Adhäsionskomplexen	105
3.5	Expression der MRLCs in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades in SH-SY5Y	107
3.6	Lokalisation der MRLCs in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums und der Stimulation mit DHEA und Testosteron mittels Fluoreszenzmikroskopie	110
3.7	Charakterisierung der MRLCs durch DSS-Kopplung	115
3.8	Erhöhte Phosphorylierung an Ser19 der MRLC durch DHEA	116
3.9	Synthese von fluoreszierenden DHEA-bzw. Testosteron-Derivaten	117
3.9.1	Bestimmung der Umsetzung des Reaktionsansatzes mittels Dünnschichtchromatographie	119
3.9.1.1	Bestimmung der vollständigen Reaktionsdauer	119
3.9.1.2	Charakterisierung mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	119
3.9.1.3	Bestimmung des geeigneten Lösungsmittels	120
3.9.1.4	Aufreinigung und Bestimmung der Ausbeute	121
3.10	Überprüfung der Funktionalität von DHEA-Bodipy	122
3.10.1	Aktivierung des Estrogen-Rezeptor α durch DHEA-Bodipy	122
3.10.2	Antiapoptotischer Effekt von DHEA-Bodipy	123
3.10.3	Induktion von Filopodien, Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen durch DHEA-Bodipy	125
3.11	Zelluläre Lokalisation von DHEA	127
3.11.1	Zelluläre Lokalisation von DHEA-Bodipy	127
3.11.2	Bestimmung der Lokalisation von DHEA mittels Antikörper	128

3.12	Transportstudien mit DHEA-Bodipy	130
3.12.1	Induktion von Stressfasern und Filopodien in Abhängigkeit der Lokalisation von DHEA	131
4	Diskussion	
4.1	Eindeutige Zuweisung der Effekte von Testosteron und die Metabolisierung des P450 Aromatase-Inhibitors Formestan	133
4.2	Eindeutige Zuweisung der Effekte von Testosteron und die Metabolisierung von Testosteron bei inhibierter 5α-Reduktase	136
4.3	Eindeutige Zuweisung der Effekte von DHEA und die Metabolisierung von DHEA bei inhibierter Sulfotransferase	137
4.4	Beeinflussung der Aktivität steroidogener Enzyme	138
4.5	Testosteron und die Aktivierung des Rac-Signalwegs	139
4.6	DHEA und die Aktivierung des Rho-Signalwegs	143
4.7	Steroide, Rho-GTPasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren	146
4.8	Aktinskelett vs. Mikrotubuli	147
4.9	Expression und Lokalisation der regulatorischen leichten Ketten (MRLCs) von Myosin II in SH-SY5Y Neuroblastomazellen	148
4.10	Funktionalität, Transport und Lokalisation des Steroidhormonderivats DHEA-Bodipy	151
4.11	Die Rolle von Rho-GTPasen in neurodegenerativen Erkrankungen	154
5	Zusammenfassung und Ausblick	156
6	Literaturverzeichnis	158
7	Anhang	
7.1	Abkürzungen	171
7.2	Abbildungsverzeichnis	172

Vorwort

Neurosteroiden können langsame genomische und schnelle nicht-genomische Effekte zeigen. Die Synthese und der Metabolismus von Neurosteroiden werden entwicklungsbedingt reguliert. In den letzten Jahren sind immer mehr schnelle Steroideffekte bekannt geworden, die sowohl über klassische als auch nicht-klassische Rezeptoren laufen. Die Erforschung nicht-genomischer Effekte von Neurosteroiden auf das Cytoskelett neuronaler Zellen und der involvierten Signalkaskaden ist zum heutigen Stand der Forschung weitgehend ungeklärt.

Diese Arbeit demonstriert die Modulation der Aktincytoskelett-Reorganisation durch die Neurosteroiden DHEA und Testosteron und eine Beteiligung komplexer Signalwege der RhoGTPase-Familie.

Des Weiteren kann erstmals der Transport und die subzelluläre Lokalisation des Neurosteroids DHEA in neuronalen Zellen gezeigt werden.

Neurodegenerative Erkrankungen, deren Ursache in einer fehlregulierten Neurosteroidogenese oder Aktincytoskelett-Reorganisation begründet sind, verdeutlichen die Notwendigkeit solcher Forschungsprojekte.

1.1 Das neuronale Cytoskelett

Neuronen und neuronale Zellen besitzen im Vergleich zu anderen Zelltypen sehr außergewöhnliche und komplexe Zellformen. Die Zellform ist bei Neuronen und neuronalen Zellen sehr eng an die Funktionalität gekoppelt und wird durch das Cytoskelett bestimmt. Das Cytoskelett ermöglicht das Auswachsen von Axonen und Dendriten während der Entwicklung eines Neurons. Durch die Bildung dieser Zellstrukturen erhält das Neuron erst seine völlige Funktionalität. Eine unterschiedliche Spezialisierung in Axonen und Dendriten führt zu einer Polarität des Neurons, die die Richtung des Informationsflusses festlegt (Grafstein, 1980). Das Auswachsen von Axonen und Dendriten wird durch ein spezialisiertes Ende, dem sogenannten Wachstumskegel, gesteuert. Wachstumskegel sind aus Filopodien und Lamellipodien zusammengesetzt, die eine amöboide Bewegung der Neuronen und neuronalen Zellen ermöglichen.

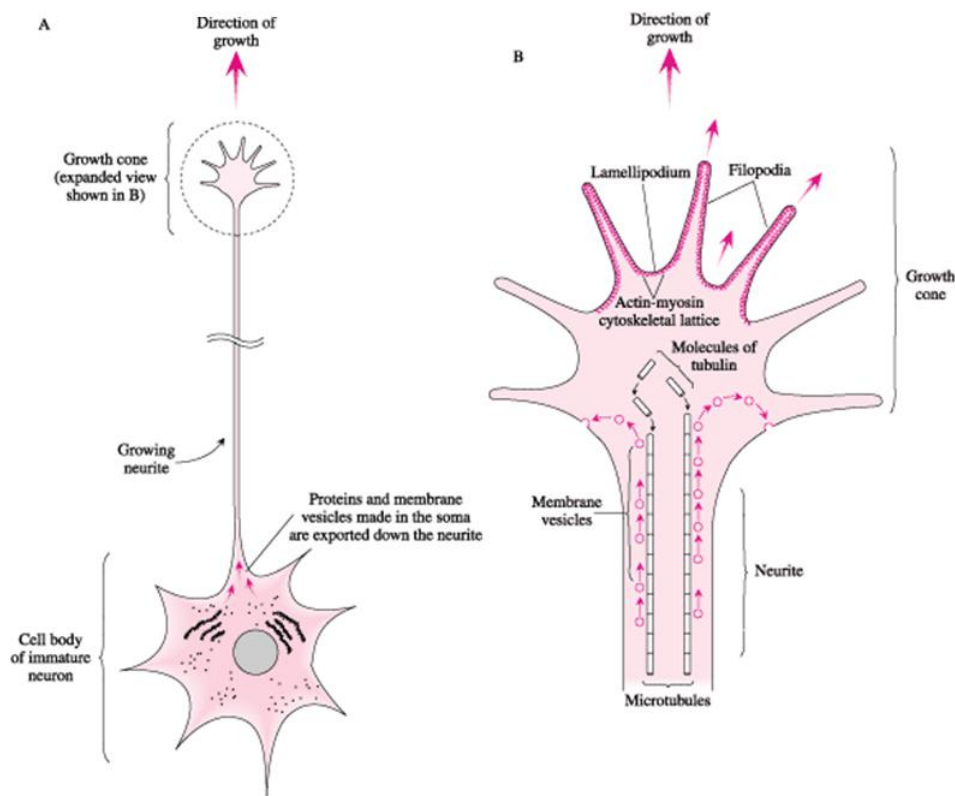


Abbildung 1: A) Schematische Darstellung einer neuronalen Zelle mit auswachsenden Neuriten. Am Ende des Neurits ist der Wachstumskegel lokalisiert. B) Vergrößerter Ausschnitt der schematischen Darstellung der cytoskelettalen Organisation eines Wachstumskegels. Das Auswachsen des Wachstumskegels wird durch Aktin-Myosin bedingte Interaktionen reguliert. Filopodien und Lamellipodien sind besonders reich an Aktin. Verändert nach (blackwellpublishing)

Axone und Dendriten sind morphologisch und funktional sehr unterschiedlich. Axone bewegen sich stereotypisch über längere Strecken. Sind sie am Ziel angekommen, werden terminale Verknüpfungspunkte ausgebildet und die Wachstumskegel in präsynaptische Enden umgewandelt. Manche Axone verzweigen sich auch beim Auswachsen und verknüpfen somit verschiedene Regionen des Nervensystems. Dendriten erstrecken sich

über kürzere Strecken und sind in der Nähe des Zellkörpers lokalisiert. Sie verzweigen sich sehr stark in Dendritenbäume. Anhand dieser dendritischen Verzweigungen kann man bestimmte Neuronen-Typen identifizieren (Luo, 2002). Die Membranen von Axonen und Dendriten besitzen außerdem hochspezialisierte Domänen, in denen der Informationsgehalt für prä- und postsynaptische Spezialisierungen enthalten ist (Grafstein, 1980).

Die Bildung von synaptischen Verknüpfungen ist keineswegs das Ende der morphologischen Entwicklung von Neuronen. Nach der initialen progressiven Phase gibt es eine regressive Phase, in der Verknüpfungen wieder gespalten und neu ausgerichtet werden. Diese kontinuierlichen morphologischen Veränderungen sind essentiell für die Vernetzung von Neuronen während der Entwicklung und die volle Funktionalität des adulten Gehirns. Die Morphogenese von Neuronen gründet sich auf Veränderungen des Cytoskeletts und seiner Interaktion mit der Plasmamembran (Luo, 2002). Das neuronale Cytoskelett besitzt die Fähigkeit, einerseits sehr dynamische, andererseits aber auch sehr stabile Strukturen auszubilden. Die mit diesen Attributen verknüpfte Assemblierung und Deassemblierung cytoskelettaler Komponenten werden von der Zelle streng reguliert. Erst die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen ermöglicht eine Aussage darüber, warum Neuronen im Alter oder bei neuronalen Erkrankungen dysfunktional werden.

1.1.1 Cytoskelett-Komponenten

Das Cytoskelett besteht hauptsächlich aus drei Typen von polymeren Filamenten, den Aktinfilamenten (\varnothing 8 nm), Mikrotubuli (\varnothing 25 nm) und Intermediärfilamenten (\varnothing 10 nm), aus Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs), Aktin- und Mikrotubuli-spezifischen Motorproteinen (z.B. Myosin und Kinesin) und „cross-linker“-Proteinen. Mikrotubuli und Neurofilamente findet man im gesamten Cytoplasma, jedoch z.B. kaum im initialen Bereich von Wachstumskegeln. Aktinfilamente sind dagegen höher in der Peripherie der Zelle konzentriert. In diesem Bereich bilden sie ein kortikales Netzwerk aus. Auch im initialen Bereich von Wachstumskegeln ist die Konzentration von Aktinfilamenten sehr hoch. Die unterschiedliche Lokalisation der Filamente bedingt auch eine differentielle Regulation der Assemblierung und Deassemblierung.

Mikrotubuli, Aktin- und Intermediärfilamente sind aus Untereinheiten zusammengesetzt, die nicht-kovalente Bindungen eingehen. Die Polymere des Cytoskeletts unterliegen einer Selbstassemblierung. Mikrotubuli bestehen aus α -, β - und γ -Tubulin. Von α - und β -Tubulin existieren viele verschiedene Isoformen. γ -Tubulin polymerisiert selbst nicht, dient jedoch als Kern für die Polymerisierung von α - und β -Tubulin. α - und β -Tubulin besitzen jeweils ein Molekulargewicht von 50 kDa und werden linear als Heterodimere zu Protofilamenten zusammengesetzt. 13 dieser Protofilamente bilden dann in zylindrischer Form den Mikrotubulus. Tubulin-Monomere sind wie Aktin-Monomere asymmetrisch und assoziieren in einer spezifischen Orientierung und verleihen dem Mikrotubulus eine Polarität. In Neuronen kommen monomere und polymere Formen vor, deren Gleichgewicht von der Zelle streng

reguliert werden (Hirokawa, 1991). In den meisten Zellen unterliegen die Mikrotubuli einer hohen Dynamik. Das Gleichgewicht zwischen Assemblierung und Deassemblierung wird als dynamische Instabilität bezeichnet. In hochdifferenzierten Zellen wie Neuronen gibt es einen hohen Anteil an Mikrotubuli, deren dynamische Instabilität unterdrückt wird. Unter diesem Aspekt kann man zwischen stabilen und dynamischen Mikrotubuli unterscheiden. Stabile Mikrotubuli wachsen sehr langsam und depolymerisieren sehr schwer, dynamische Mikrotubuli wachsen sehr schnell, depolymerisieren aber auch sehr schnell. Ihre Halbwertszeit beträgt in vivo ca. 5 Minuten (Baas, 1990). Bei der Tubulin-Assemblierung kommt es zu einer Nucleotid-Hydrolyse, die die Kinetik der Reaktion beeinflusst, jedoch nicht zwingend notwendig für die eigentliche Polymerisierung ist. Da das Tubulin-Polymer eine Polarität aufweist, kann man ein + Ende und ein – Ende definieren.

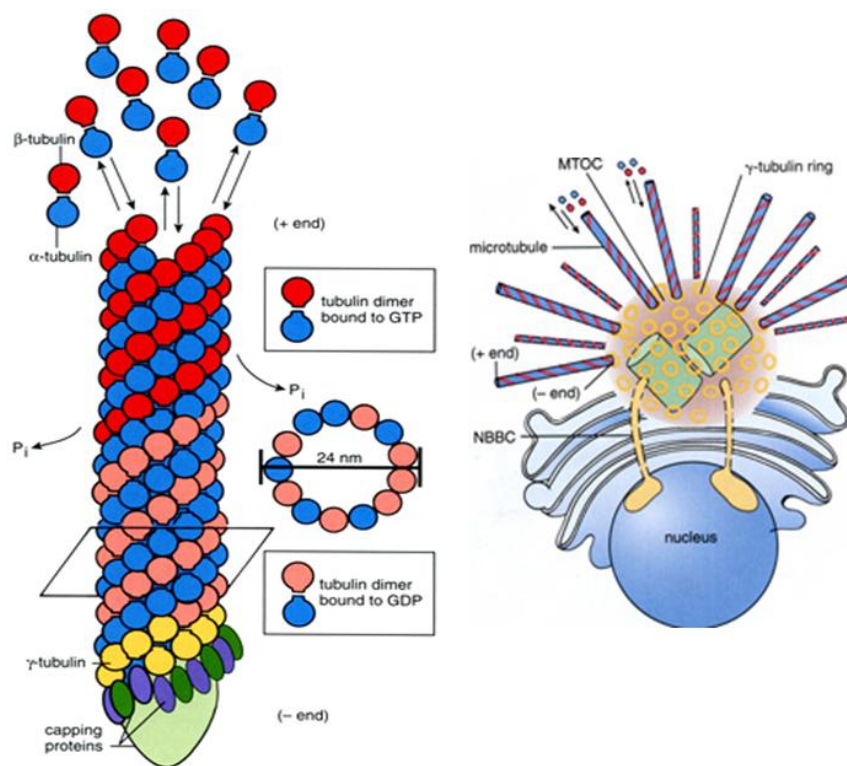


Abbildung 2: Links: Schematische Darstellung eines wachsenden Mikrotubulus (Details siehe Text); rechts: Schematische Darstellung der MTOCs. Die Mikrotubuli sind mit ihren – Enden im MTOC verankert und somit gegenüber depolymerisierenden Einflüssen geschützt. Die + Enden zeigen in Richtung der Zelltermini. Die Ringe aus γ-Tubulin bilden den Polymerisationskern. Verändert nach Basic Histology (D502); Cellular Ultrastructure

Das Auswachsen eines Tubulin-Polymers erfolgt vom – Ende zum + Ende. Ohne GTP-Hydrolyse sind die Gleichgewichtskonstanten an beiden Enden gleich, d.h. die Assemblierung am + Ende würde genauso schnell ablaufen wie die Deassemblierung am – Ende. Damit es zu einer gerichteten Bewegung kommt, wird die Geschwindigkeit der Assemblierung am + Ende durch die GTP-Hydrolyse erhöht. Monomeres Tubulin liegt hauptsächlich in der GTP-Form vor, da in dieser Form eine Hydrolyse sehr erschwert wird. Werden die Heterodimere in das bestehende Polymer eingebaut, wird das GTP an β-Tubulin zu GDP hydrolysiert. Diese Hydrolyse führt zu einer Konformationsänderung in der

Untereinheit und reduziert die Affinität zu benachbarten Untereinheiten. Somit kann das GDP leicht vom Tubulin-Polymer abdissoziieren. Die GTP-Hydrolyse läuft zeitverzögert ab. Dies führt dazu, dass sich am + Ende Untereinheiten der GTP-Form anhäufen. Aufgrund der erschwerten Dissoziation der GTP-Form kommt es zu einer Addition. Dieses GTP-Kappen-Modell ist weitgehend akzeptiert. Die Hydrolyserate ist dann mit der Additionsrate weitgehend identisch. Ist die Hydrolyserate am + Ende schneller als die Additionsrate, kommt es zu einer Anhäufung von GDP-Tubulin und zu einer Depolymerisierung des Tubulin-Filaments (Grafstein, 1980) (Baas, 1990). Die – Enden der Mikrotubuli sind sehr stabil gegenüber depolymerisierenden Einflüssen, da sie in Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) verankert sind. Die + Enden der Mikrotubuli sind stets in Richtung der Zelltermini oder in Richtung der Wachstumskegel ausgerichtet. Mikrotubuli erstrecken sich meist bis zur Basis eines Wachstumskegels, sie können jedoch auch weiter vordringen und sich in der Membran von Filopodien und Lamellipodien verankern. Die Anordnung der Mikrotubuli in einem Wachstumskegel ist nicht parallel oder linear, sondern eher gebündelt und gekrümmt. In Axonen haben die Mikrotubuli eine lineare und parallele Anordnung.

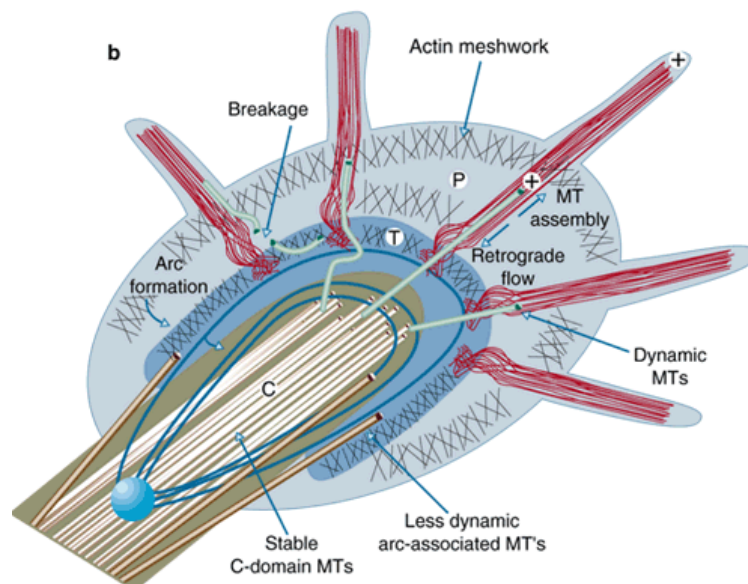


Abbildung 3: Modell für Mikrotubuli-Aktin-Interaktionen in einem neuronalen Wachstumskegel. Die Mikrotubuli erstrecken sich nur bis zu der Basis des Wachstumskegels. In den Filopodien liegt Aktin in gebündelter, paralleler Anordnung vor, in Lamellipodien in der Form eines Netzwerkes (Rodriguez, 2003)

In Dendriten gibt es keine einheitliche Anordnung von Mikrotubuli, die sich in einem selektiven Transport von Substraten bemerkbar macht (Reinsch, 1991).

Mikrotubuli und Aktin-Filamente stehen in einer inhibitorischen Beziehung zueinander. Das Aktin-Netz inhibiert eine Mikrotubuli-Expansion und umgekehrt (E.Nogales, 2000).

Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAPs) spielen eine große Rolle bei der Assemblierung und Stabilisierung von Mikrotubuli. Im Gegensatz zu Motorproteinen (z.B. Myosin) binden MAPs Nucleotid-unabhängig an Mikrotubuli. Die bekanntesten Vertreter der neuronalen MAPs sind MAP2 und Tau. MAP2 kommt am häufigsten im Gehirn vor. Es gibt verschiedene MAP2-

Isoformen, die abhängig von ihrem Molekulargewicht in zwei Gruppen eingeteilt werden. MAPs mit einem hohen Molekulargewicht sind MAP2a und MAP2b, mit niedrigem Molekulargewicht sind MAP2c und MAP2d (Przyborski, 1995). Die Expression der MAP-Isoformen wird während der Entwicklung reguliert. MAP2a wird am meisten im adulten Gehirn exprimiert, MAP2b während der gesamten Entwicklung und MAP2c dagegen nur in frühen Entwicklungsstadien. MAP2 werden hauptsächlich in Dendriten von Neuronen exprimiert (Bernhardt, 1984) (Burgoyne, 1984) (Kosik, 1987). Sie regulieren das Auswachsen von Neuriten und sind an der Polarisierung von Neuronen beteiligt. Die Affinität der MAPs zu den Mikrotubuli wird durch Phosphorylierung reguliert. Eine erhöhte Phosphorylierung führt zu einer Abnahme der Affinität der MAPs zu den Mikrotubuli und damit zu einer verminderten Stabilität (Georgiev, 2004). MAP2 spielen somit eine wichtige Rolle in der neuronalen Plastizität.

Es gibt hauptsächlich drei Klassen cytoskelettaler Motorproteine in Neuronen: Neuronales Myosin, das mit Aktin interagiert, und zwei Motorproteine, Kinesin und Dynein, die mit den Mikrotubuli interagieren. Kinesin und Dynein sind für intrazelluläre Transportprozesse entlang der Mikrotubuli essentiell.

Die meisten Motorproteine sind Dimere, die jeweils aus einer Kopfregion und einer Schwanzregion bestehen. In der Kopfregion befindet sich die Motor-Domäne mit einer Bindungsstelle für ATP und einer für Aktin oder Tubulin. Kinesin und Myosin haben verschiedene Wege entwickelt, um aus einer kleinen ATP bedingten Konformationsänderung eine große Konformationsänderung eines mechanisch assoziierten Elements zu erzielen.

Aktin ist neben den Histonen das höchst konservierte Protein in der Zelle. Aktin kommt in verschiedenen Isoformen vor, als α -Aktin, β -Aktin und γ -Aktin. α -Aktin ist mit kontraktilen Strukturen in Muskelzellen assoziiert, β -Aktin und γ -Aktin kommen in Nicht-Muskel-Zellen vor, wobei β -Aktin die Hauptrolle in der Polymerisierung von Aktin-Filamenten spielt.

Aktin existiert als globuläres Monomer (G-Aktin) und als filamentöses Polymer (F-Aktin), welches aus G-Aktin-Untereinheiten zusammengesetzt ist. Jedes Aktin Molekül enthält ein Mg^{2+} -Ion, das mit einem ATP oder ADP komplexiert ist. Es gibt vier verschiedene Zustände des Aktins in der Zelle: ATP-G-Aktin, ADP-G-Aktin, ATP-F-Aktin und ADP-F-Aktin, wobei ATP-G-Aktin und ADP-F-Aktin dominieren.

Charakteristisch für Aktin ist, wie für Tubulin, die Nucleotid-Hydrolyse bei der Assemblierung. Die Nucleotide werden während der Polymerisierung hydrolysiert. Auch hier beeinflusst die Hydrolyse die Kinetik, ist aber für den eigentlichen Polymerisierungsvorgang nicht zwingend notwendig. Die Polymerisierung von G-Aktin in F-Aktin ist reversibel. Das Aktinfilament weist eine Polarität auf, da alle Untereinheiten in die gleiche Richtung weisen. Am – Ende ist die ATP-Bindestelle zum umgebenden Medium ausgerichtet, am entgegengesetzten Ende steht sie mit einer benachbarten Aktin-Untereinheit in Kontakt. Aktin kann gebündelt oder als Netzwerk in der Zelle vorkommen. In der gebündelten Form liegen die Aktinfilamente dicht gepackt in paralleler Anordnung. In der Form des Netzwerkes

liegt Aktin weniger dicht und überkreuzt vor. Zellen enthalten zwei Typen von Aktin-Netzwerken. Das eine ist planar und mit der Plasmamembran assoziiert, das andere ist dreidimensional und verleiht dem Cytosol seine gelartige Konsistenz.

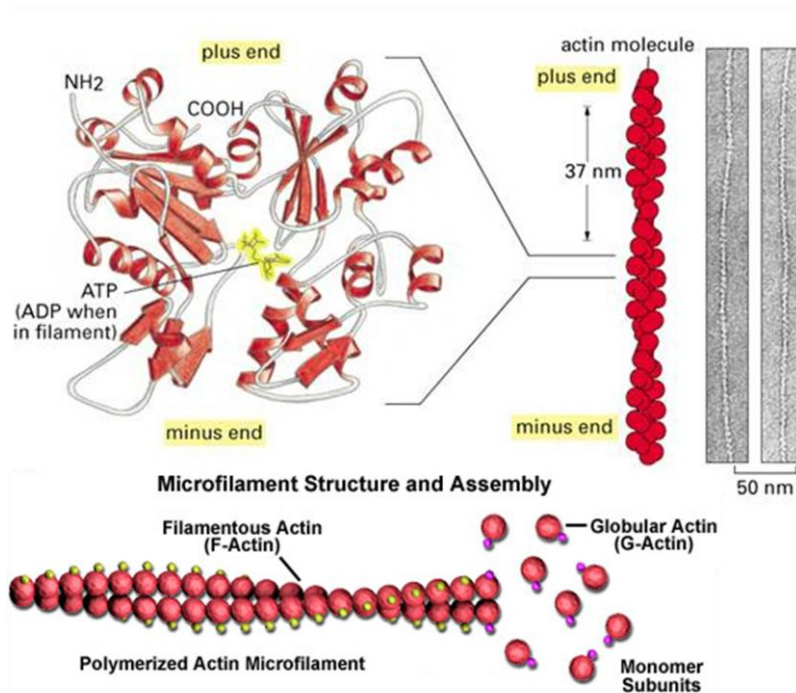


Abbildung 4: Schematische Darstellung von G-Aktin und F-Aktin. G-Aktin wird durch ATP-Hydrolyse in F-Aktin polymerisiert. Das Aktinfilament weist ein – Ende und ein + Ende auf. Die Struktur von F-Aktin erinnert an zwei umeinandergeschlungene Perlenketten (Molecular Expressions)

Diese Aktinstrukturen werden durch „cross-linker“-Proteine zusammengehalten. Die Länge und die Flexibilität dieser Proteine entscheiden, ob es zu einer Bündelung der Aktinfilamente oder zur Ausbildung eines Netzwerkes kommt. Die meisten „cross-linker“-Proteine besitzen zwei Aktin-Bindestellen, die sogenannten CH-Domänen (homolog zu Calponin, einem Muskelprotein). Zu den kürzesten „cross-linker“-Proteinen gehören Fimbrin und α -Actinin, die in gebündelten Strukturen zu finden sind. Zu den längsten „cross-linker“-Proteinen gehören Filamin, Spectrin und Dystrophin, die in der netzartigen Struktur in der kortikalen Region vorkommen. Das Aktin-Netzwerk wird durch Membran-Mikrofilament-bindende Proteine in der Plasmamembran verankert. Lamellipodien bestehen aus einem Netzwerk von stark verzweigten Aktin-Filamenten, Filopodien enthalten lange, parallel angeordnete Aktinfilamente.

Stressfasern enthalten kontraktile Aktinomyosin-Bündel, die wichtig für die Zelladhäsion und morphologische Veränderungen (besonders für das Zurückziehen der Zelle) sind. Stressfasern bestehen aus sehr kurzen Aktinfilamenten mit alternierender Polarität. α -Actinin ist hier ein wichtiger „cross-linker“ und ist mit Myosin ebenso wie in Myofibrillen von Muskelzellen periodisch verteilt.

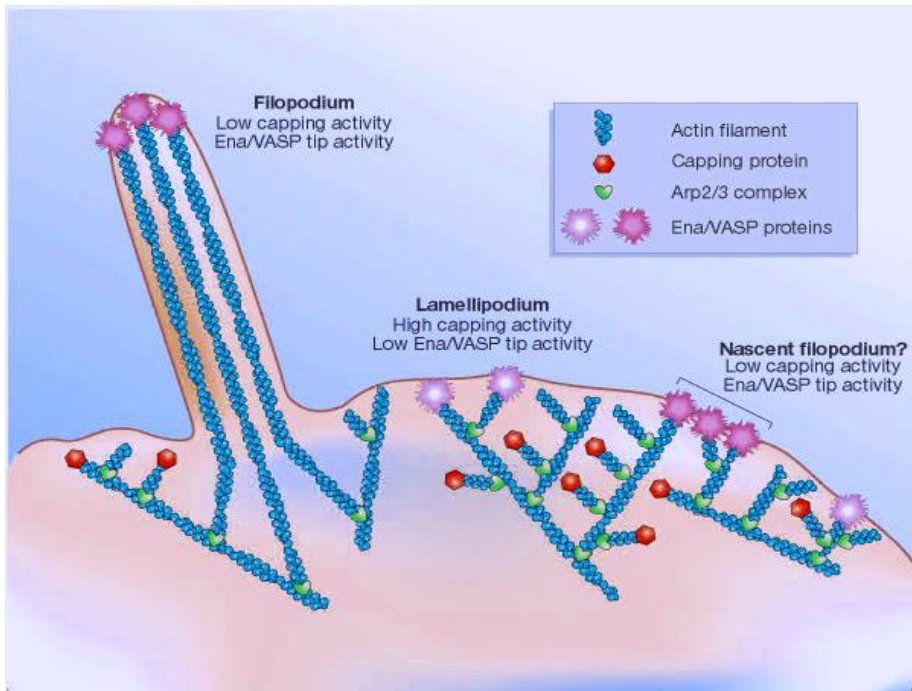


Abbildung 5: Aktinfilamente polymerisieren an den schnell wachsenden Enden in der Nähe der Plasmamembran. Die Polymerisierung wird durch die „capping“-Proteine beendet. Ist die „capping“-Aktivität hoch, dann kommt es zu einem Abbruch der Polymerisierung und es entstehen kurze Filamente. Dies fördert die Ausbildung eines Aktinnetzwerks, das zur Entstehung von Lamellipodien beiträgt. Filopodien entstehen, wenn Filamente des Aktinnetzwerks durch Ena/VASP Proteine rekrutiert werden. Die Filamente wachsen dann länger aus, da Ena/VASP Proteine das „capping“ inhibieren (Schafer, 2004)

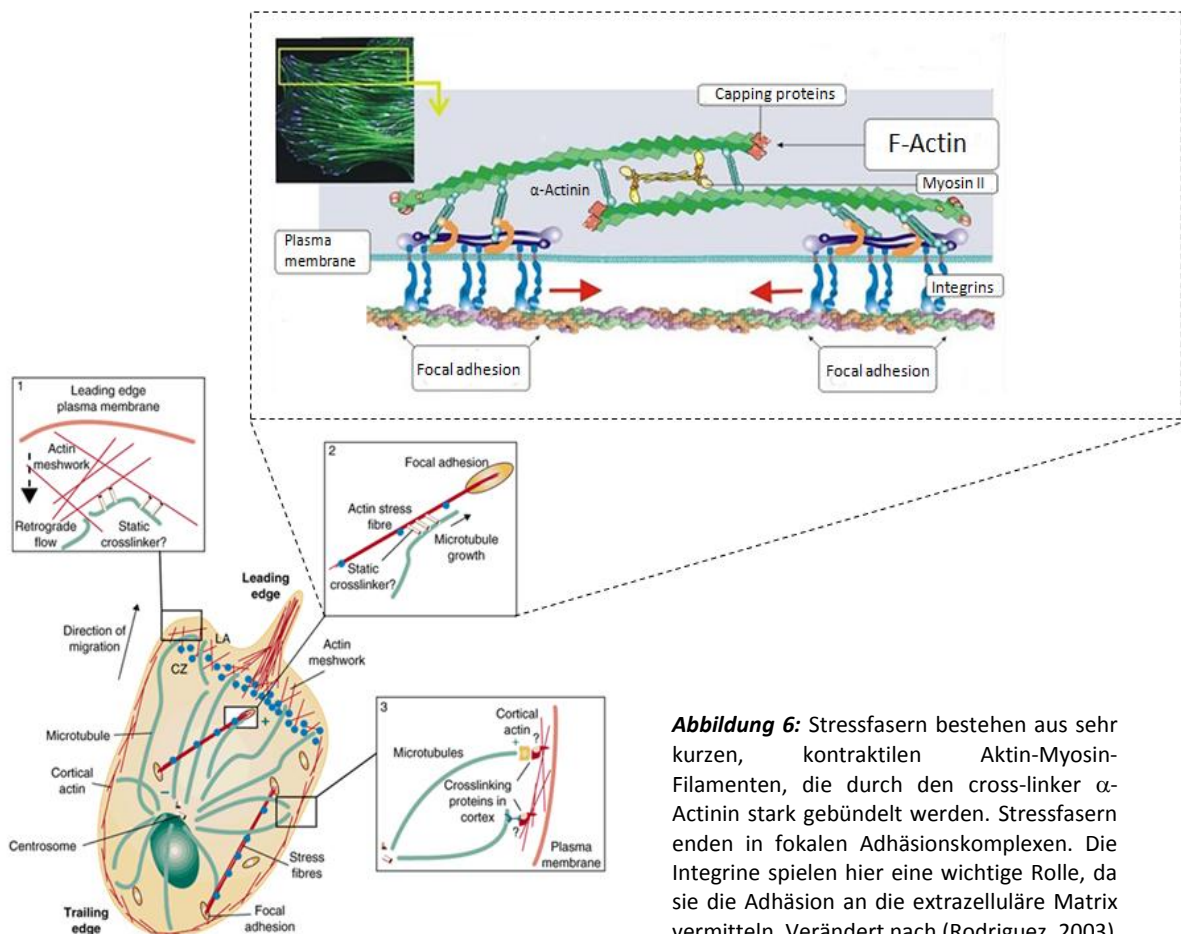


Abbildung 6: Stressfasern bestehen aus sehr kurzen, kontraktiven Aktin-Myosin-Filamenten, die durch den cross-linker α -Actinin stark gebündelt werden. Stressfasern enden in fokalen Adhäsionskomplexen. Die Integrine spielen hier eine wichtige Rolle, da sie die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix vermitteln. Verändert nach (Rodríguez, 2003)

Die Aktin-Polymerisierung wird durch verschiedene und komplexe Signalwege induziert. Zentrale Regulatoren der Aktin-Assemblierung sind Arp2/3 (actin-related proteins) und Profilin. Arp2/3 sowie Profilin binden direkt an G-Aktin und stimulieren die Polymerisierung zu F-Aktin (Millard, 2004). Schlüsselregulatoren des Aktin-Cytoskeletts sind die Rho-GTPasen (siehe Abschnitt 2) (Luo, 2002). Sie regulieren die Aktin-Polymerisierung und die Myosin-Motor-Aktivität, die die Basis eines funktionalen Aktin-Cytoskeletts und somit einen wichtigen Teil der Morphogenese darstellen.

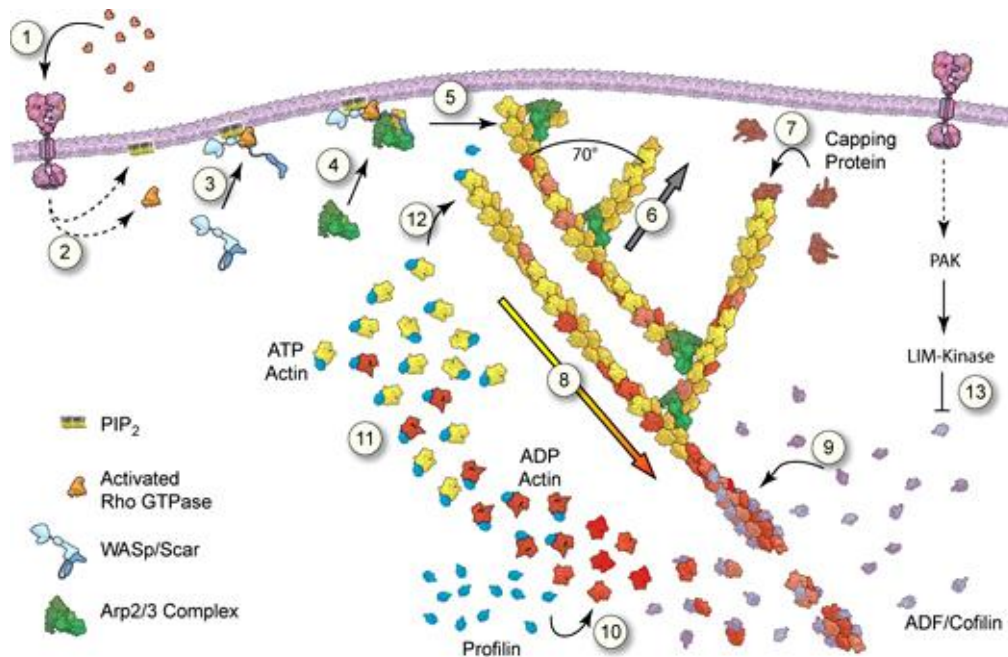


Abbildung 7: Schematische Abbildung des Rearrangements des Aktin-Cytoskeletts eines Wachstumskegels. Verschiedene extrazelluläre Signalwege aktivieren Rezeptoren (1). Die mit diesen Rezeptoren assoziierten Signalwege aktivieren dann die entsprechenden Rho-GTPasen und PIP₂ (2), die nachfolgend die WASp/Scar Proteine aktivieren (3). Die WASp/Scar Proteine aktivieren den Arp2/3 Komplex (4), der mit Aktin-Monomeren an einem bestehenden Aktinfilament bindet und zur Ausbildung einer Verzweigung führt (5). Ein schnelles Auswachsen dieser Verzweigungen (6) führt zu einer Vorwärtsbewegung der Membran. „Capping-Proteine“ (7) beenden das Auswachsen der Aktinfilamente. Die ATP-Hydrolyse an den Aktinuntereinheiten führt zu einem Abbau der älteren Aktinfilamente (8). ADF/Cofilin fördert die Dissoziation des γ -Phosphats, trennt ADP-Aktin-Filamente und fördert die Dissoziation des ADP-Aktins vom Filamentende (9). Profilin katalysiert den Austausch von ADP gegen ATP (10). Es werden Profilin-ATP-Aktin-Komplexe (11) gebildet, die als Pool für das Auswachsen neuer Filamente dienen (12). GTPasen der Rho-Familie aktivieren PAK und LIM-Kinase (13). Diese Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung von ADF/Cofilin und zu einer Herabsetzung des „turnover“ der Aktinfilamente. Verändert nach (Pollard, 2003).

1.1.2 Myosin II in nicht-Muskel Zellen

Myosine sind wichtige Motorproteine und Modulatoren des Aktin-Cytoskeletts. Sie sind beteiligt an Transportprozessen, Morphogenese und Cytokinese. Im Gegensatz zu Muskelzellen enthalten Nicht-Muskel-Zellen nur einen geringen Gehalt an Myosin, das nicht in Sarkomer-ähnlichen Strukturen organisiert ist. Myosine aus Muskel- und nicht Muskel-Zellen besitzen einen ähnlichen Aufbau und können selbst assemblieren.

Das Myosin-Molekül ist ein Hexamer, bestehend aus einem Paar schweren Ketten (M_r 200kDa; MHC, Myosin Heavy Chain) und zwei Paaren an leichten Ketten, der

regulatorischen und der essentiellen leichten Kette (M_r 16-25kDa; MLC, Myosin Light Chain). Jeweils eine der leichten Ketten ist über eine nicht kovalente Bindung mit der globulären Domäne (S1) der schweren Kette verbunden. Die S1-Domäne der schweren Kette beinhaltet die Nucleotid- (ATP) und Aktinbindestelle. Der Hauptteil der schweren Kette wird durch die α -helikale Schwanz-Region gebildet, die für die Filament-Bildung essentiell ist.

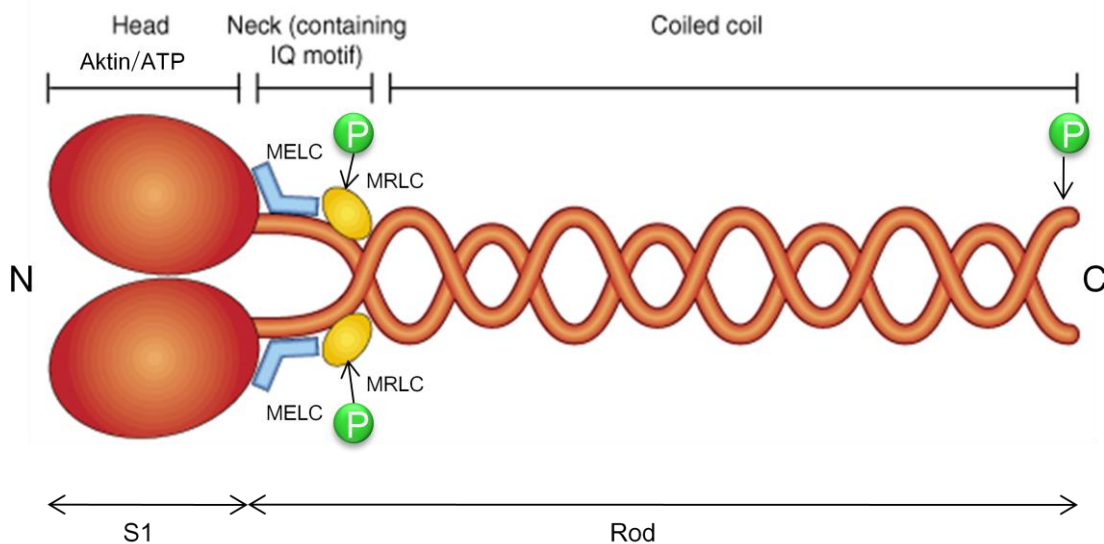


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Myosin II. Das Myosin II-Motorprotein ist ein Hexamer, bestehend aus zwei schweren Ketten (MHC) und vier leichten Ketten (MLC), den regulatorischen (MRLC) und den essentiellen (MELC) leichten Ketten. Die leichten Ketten binden in der „neck“-Region der schweren Ketten, die ein IQ-Motiv enthält. In der globulären Domäne am N-Terminus befindet sich die ATP-Bindestelle. Die schweren Ketten können am C-Terminus phosphoryliert werden, die MRLC am N-Terminus. Dort befinden sich 5 Stellen, an denen eine Phosphorylierung erfolgen kann. Verändert nach (Mulvihill, 2001)

Die Myosin-Aktin-Interaktion wird durch Phosphorylierung reguliert. Durch den Phosphorylierungsstatus wird die ATPase-Aktivität beeinflusst. Die schwere Kette kann am C-Terminus, die regulatorische leichte Kette (MRLC) am N-Terminus reversibel phosphoryliert werden (Kendrick-Jones).

1.1.2.1 Neuronale Myosine

Die Myosin-Superfamilie beinhaltet bis zu 18 Klassen von Myosinen. In Neuronen werden Myosine der Klassen I, II, V, VI und IX exprimiert. Die vier ersten Klassen sind an Transportprozessen in Neuronen beteiligt (besonders I, V, VI). Das am häufigsten untersuchte Myosin ist Myosin II. In Neuronen werden 3 Isoformen des „non-muscle“ Myosin II exprimiert: Myosin IIA, IIB und IIC. Myosin IIB ist kortikal im Zellkörper und Axon verteilt. Myosin IIA ist ebenso kortikal lokalisiert, jedoch ist es stärker in Neuriten verteilt als Myosin IIB. In Wachstumskegeln von Neuronen findet man beide Typen von Myosinen. Myosin IIB

spielt eine wichtige Rolle beim Auswachsen von Neuriten. Myosin IIA reguliert die Ausbildung von fokalen Adhäsionspunkten und das Zurückziehen von Neuriten (Elkin, 2000)

1.1.2.2 Regulation von Myosin II

Die molekularen Mechanismen der Aktivitätsregulation von Myosin II in Neuronen stellen wichtige Prozesse dar, die jedoch bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten.

Die Hauptregulation von Myosin II erfolgt über den Phosphorylierungsstatus der regulatorischen leichten Ketten des Myosins (MRLC) (Adelstein, 1981) (Fujita, 2001) (Schmidt, 2002). In diese Regulation sind verschiedene und komplexe Signalkaskaden involviert. Eine Phosphorylierung der MRLC aktiviert die Aktin bindende Domäne von Myosin II und führt über eine Konformationsänderung der schweren Ketten des Myosins (MHC) zur Filament-Bildung (Suzuki, 1978). Im unphosphorylierten Zustand der MRLC liegt eine „steady state“ ATPase-Aktivität vor, die nur schwach durch die Bindung von Aktin aktiviert werden kann. Durch eine Phosphorylierung kann die ATPase-Aktivität um das 10 fache erhöht werden (Kendrick-Jones).

Myosin IIA und IIB teilen sich die gleichen leichten Ketten (Grant, 1990). Somit werden die beiden Isoformen durch die gleichen Signalwege reguliert. Es gibt zwei wesentliche Signalwege, die die Phosphorylierung der MRLC regulieren (die MRLC besitzt 5 phosphorylierbare Stellen (Ikebe, 1985) (Ikebe, 1987) (Satterwhite, 1992), einen Calcium-abhängigen und einen Calcium-unabhängigen Weg. Der Calcium-abhängige Weg der Regulation der MRLC erfolgt über die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK). Die Phosphorylierung der MRLC über die MLCK erfolgt an den Aminosäureresten Thr18 und Ser19. In vitro wird die Monophosphorylierung an Ser19 bevorzugt. Eine weitere Phosphorylierung an Thr18, die zur Diphosphorylierung der MRLC führt, erfolgt nur bei hohen Konzentrationen der MLCK (Ikebe, 1985) (Ikebe, 1986). Die Monophosphorylierung an Ser19 aktiviert dann die ATPase-Aktivität der globulären Domäne. Eine Diphosphorylierung an Ser19/Thr18 führt noch zu einer Verstärkung der ATPase-Aktivität und somit zu einer erhöhten Filament-Bildung des Myosin II (Ikebe, 1988).

Die Aktivität der MLCK kann durch die p21-aktivierte Kinase (PAK) inhibiert werden (Sanders, 1999). MLCK und PAK kommen beide in Wachstumskegeln vor, dabei spielt die MLCK eine wichtige Rolle in der Aktivitätsregulierung von Wachstumskegeln (Bridgman, 2003). Die Regulation von PAK erfolgt durch die GTPasen Cdc42 und Rac (siehe Abschnitt 2.1.1 und 2.1.2) (Chew, 1998).

Der Calcium-unabhängige Weg erfolgt über die Myosin-Phosphatase. Die Myosin-Phosphatase wird ebenfalls über eine GTPase, die Rho-Kinase (siehe Abschnitt 2.1) reguliert. Eine Aktivierung der Rho-Kinase führt zu einer Monophosphorylierung der MRLC an Ser19 und zu einer Inhibierung der Myosin-Phosphatase. Dieser Calcium-unabhängige Weg spielt besonders in neuronalen Zellen und Neuronen eine wichtige Rolle (Amano,

1998) (Hirose M. , 1998) (Somylo, 2000). Die Dephosphorylierung der MRLC erfolgt durch die Myosin-Phosphatase, deren Aktivität hauptsächlich durch zwei Wege reguliert wird. Der direkte Weg läuft über eine Phosphorylierung der Myosin-Phosphatase durch die Rho-Kinase (Amano, 1998) (Feng, 1999). Der andere Weg läuft indirekt, hierbei wird ein Inhibitor-Protein CPI-17 durch die Protein-Kinase C (PKC) phosphoryliert und aktiviert (Kitazawa, 2000) (Murakami N. , 1998). Beide Wege führen zu einer Inhibierung der Myosin-Phosphatase. Die PKC kann aber auch die MRLC direkt an den Aminosäureresten Ser1, Ser8 und Thr9 phosphorylieren. Dies führt wiederum zu einer Inhibierung der MLCK (Ikebe, 1987) (Turbedsky, 1997).

Neben der Regulierung des Phosphorylierungsstatus der MRLC gibt es noch einen weiteren Mechanismus, um die Aktivität bzw. die Filament-Bildung von Myosin II zu regulieren. Dieser Signalweg schließt die Phosphorylierung der schweren Ketten des Myosin II (MHC) mit ein. Hierbei wird die Bildung von bipolaren Filamenten, die essentiell für Migrations- und Kontraktionsvorgänge sind, reguliert (Hodge, 1992). Die Filament-Bildung von Myosin IIB wird durch eine Phosphorylierung der MHC an verschiedenen Stellen des C-Terminus durch die PKC und Casein-Kinase II inhibiert. Diese Phosphorylierung scheint Isoform-spezifisch zu sein, da eine Phosphorylierung der MHC von Myosin IIA zu keiner Inhibierung der Filament-Bildung führt. Beide Kinasen sind wichtige Aktivatoren von second messenger Kaskaden (Murakami N. , 2000).

Die Filament-Bildung des MHC IIA wird durch ein Calcium bindendes Protein der S100 Familie, dem Mts1 oder S100A4 reguliert. Eine Bindung dieses Proteins an die schwere Kette des MHC IIA führt zu einer Deassemblierung der Filamente, da es die ATPase-Aktivität und eine Phosphorylierung durch die PKC inhibiert (Ford, 1997).

1.2 Rho-GTPasen

Die GTPasen der Rho-Familie sind eine der wichtigsten Regulatoren des Aktin-Cytoskeletts in eukaryontischen Zellen, von der Hefe bis zum menschlichen Organismus. Die morphologischen Veränderungen, die während der neuronalen Entwicklung auftreten, werden durch die Rho-GTPasen reguliert. Die Rho-GTPasen gehören zu der Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen (~ 200 AS lang). Die am häufigsten untersuchten Rho-GTPasen sind RhoA (Ras homologous member A), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1) und Cdc42 (cell division cycle 42). Rho-GTPasen agieren als molekulare Schalter und liegen in zwei Stadien vor, einem aktiven GTP-gebundenem und einem inaktiven GDP-gebundenem Stadium. Aktiviert wird die Rho-GTPase, wenn es zu einem Austausch von GDP zu GTP kommt. Diesen Austausch ermöglichen Guanin-Austauschfaktoren (GEFs). Die Abschaltung des Signals erfolgt durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs). Aktivierte Rho-GTPasen können an viele Effektoren binden und somit viele unterschiedliche zelluläre Funktionen beeinflussen (Luo, 2000).

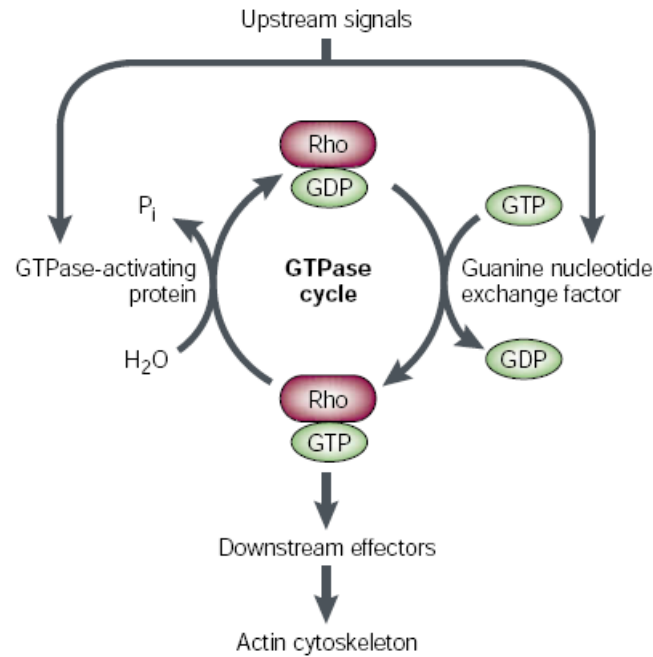


Abbildung 9: Rho-GTPasen als molekulare Schalter. Die Rho-GTPase-Aktivität wird durch die Guanin-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) reguliert. Im GTP-gebundenen Zustand ist die Rho-GTPase aktiviert und kann zur Signalweiterleitung an die nachfolgenden Effektoren binden (Luo, 2000).

1.2.1 Regulation der neuronalen Morphogenese durch Rho-GTPasen

Rho-GTPasen sind die Schlüsselregulatoren neuronaler Entwicklungsprozesse. Sie regulieren das Axon- und Dendritenwachstum, sowie Migration, Polarität und Synapsenbildung (Luo, 2000).

Rac und Cdc42 kann man als positive Regulatoren bezeichnen, da sie zum Auswachsen von Dendriten und Axonen führen. Rho kann man als negativen Regulator bezeichnen, da eine Aktivierung von Rho zum Zurückziehen von Neuriten führt. Rho-GTPasen sind auch an der Führung von Axonen beteiligt. Die Richtungsbestimmung eines Axons läuft über eine selektive Stabilisierung und Destabilisierung von Filopodien und Lamellipodien (Luo, 1994).

1.2.1.1 Rac-Effektoren der Aktin-Reorganisation

Ein gut untersuchter Effektor von Rac ist die Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-Kinase (PI-4-P5K). Die Interaktion erfolgt direkt und ist somit nicht GTP-abhängig (Tolias, 1998). Eine Aktivierung der PI-4-P5K erhöht den PIP₂-Level, dies führt dann zu einer Polymerisierung von Aktin (Tolias, 2000) (Hartwig, 1995). Ein weiterer Effektor von Rac ist ein dem WASP-Protein ähnliches Protein, WAVE. WAVE interagiert und aktiviert den Arp2/3 Komplex (Machesky, 1999).

1.2.1.2 Cdc42-Effektoren der Aktin-Reorganisation

Neben vielen Cdc42 Effektoren spielt das neuronale Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP) eine wichtige Rolle (Kolluri, 1996). N-WASP ist ein ubiquitäres Protein, kommt dennoch in größeren Mengen im Nervensystem vor und ist essentiell für die durch Cdc42 initiierte Bildung von Filopodien (Miki, 1998). N-WASP bindet an Aktin-bindende Proteine 2 und 3 (ARP2/3), Profilin und G-Aktin und stimuliert somit die Aktinpolymerisierung (Machesky, 1999). Des Weiteren interagiert Cdc42 mit zwei Serin-/Threonin-Kinasen (MRCK α und MRCK β), die in die Aktin-Reorganisation und Filopodien-Bildung involviert sind. Diese MRCKs können dann die MRLCs phosphorylieren (Leung, 1998). Ein weiterer Effektor von Cdc42 ist PAK4, ein neues Mitglied der PAK-Familie. Auch diese Interaktion führt zur Ausbildung langer Filopodien (Abo, 1998).

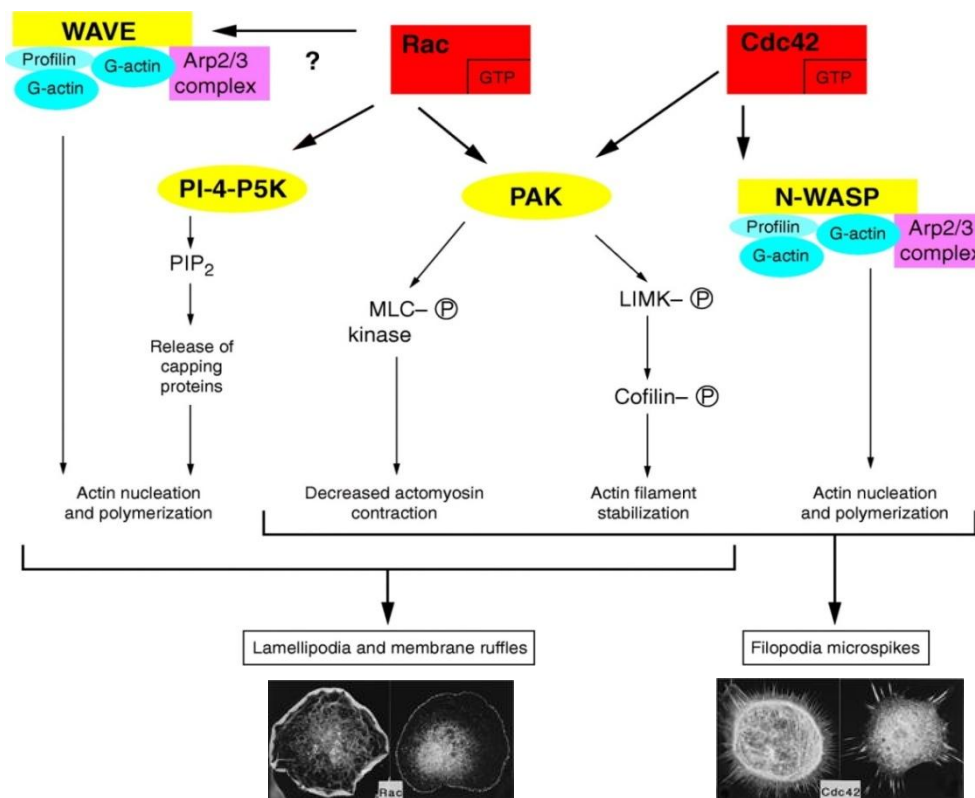


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Signalwege, die in der Rac- und Cdc42-induzierten Bildung von Lamellipodien und Filopodien involviert sind (Details siehe 1.2.1.1-1.2.1.3); verändert nach (Bishop, 2000)

1.2.1.3 Gemeinsame Effektoren von Rac und Cdc42

Ein wichtiger Effektor beider Rho-GTPasen sind PAK1, 2 und 3 (Manser, 1995). PAK aktiviert dann nachfolgend die LIM-Kinase, die Cofilin phosphoryliert und inhibiert (Edwards, 1999). Durch diese Inhibierung kommt es zu einer Depolymerisierung von F-Aktin. Parallel zu diesem Signalweg kann PAK auch die MLCK phosphorylieren und somit inhibieren. Dieser Weg führt dann zu einer verminderten Phosphorylierung der MRLCs und zu einer verminderten Filament-Assemblierung (Sanders, 1999).

Andere Studien behaupten, dass eine Aktivierung von PAK zu einer erhöhten Phosphorylierung der MRLCs führt. Diese Phosphorylierung der MRLC soll wahrscheinlich direkt durch PAK erfolgen (Brzeska, 2004). Rac induziert auch die Phosphorylierung der MHC II, dies führt zu einer Deassemblierung von Aktinomyosin und zum Auswachsen von Zellausläufern (Bresnick, 1999).

1.2.2 Rho induzierte Aktin-Reorganisation und Myosin II-Aktivierung

Für die Assemblierung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen sind meist zwei Rho-Effektoren verantwortlich, die Rho-assoziierte Kinase ROK und Dia. Bei den ROKs handelt es sich um Rho-assoziierte Serin/Threonin-Kinasen mit den Isoenzymen p160ROCK (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase) und ROK α (Matsui, 1996). Bei den wichtigsten Substraten von ROCK handelt es sich um die MRLCs (Amano, 1996) und die MBS (mysin binding subunit) der MLC-Phosphatase (Kawano, 1999), die eine Schlüsselrolle in der Filament-Assemblierung spielen. Die MLC-Phosphatase wird durch Phosphorylierung inhibiert. Diese Inhibierung führt wiederum zu einer Erhöhung der MRLC-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung der MRLC findet an Ser19 statt, wodurch die ATPase-Aktivität von Myosin II erhöht und die Assemblierung von Aktinomyosinfilamenten gefördert wird (Amano, 1996) (Kawano, 1999). An HeLa-Zellen konnte erstmals auch eine Diphosphorylierung der MRLC an Ser19/Thr18 durch die Rho-Kinase gezeigt werden (Ueda, 2002). Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass es auch zu einer direkten Bindung von Rho-GTP an die MBS der MLC-Phosphatase kommen kann (Kimura, 1996).

Ein weiterer Effektor der Rho-Kinase ist die LIM-Kinase. Wird die LIM-Kinase phosphoryliert, führt dies zu einer Phosphorylierung von Cofilin, das dann inhibiert wird. Die Inhibierung von Cofilin stabilisiert die Filamentstrukturen des Aktins (Maekawa, 1999). Die ERM- (Ezrin/Radixin/Moesin) Familie wird ebenfalls durch die Rho-Kinasen reguliert. Die ERM-Proteine sind für die Verankerung von Aktin in der Membran verantwortlich (Bretscher, 1999). Man vermutet, dass für die korrekte Ausbildung von Stressfasern nicht nur die Rho-Kinasen aktiviert werden müssen, sondern auch das Protein Dia (Dia1 und Dia2 in Säugern) (Watanabe, 1999). Dia ist ein Mitglied der Formin-Homologie-(FH) Familie. Dia bindet an Profilin und Profilin an G-Aktin. Dies führt zu einer erhöhten Aktin-Polymerisierung und zur Ausbildung von Stressfasern (Wasserman, 1998).

Auch Lipide spielen eine wichtige Rolle im Rearrangement des Aktin-Cytoskeletts. PIP₂ reguliert die durch Rho initiierte Erhöhung der Aktin-Polymerisierung. PIP₂ wird durch die PI-4-P5K gebildet und dies führt auch zu einer Induktion von fokalen Adhäsionspunkten (Gilmore, 1997). Die PI-4-P5K könnte somit eine Adapterrolle zwischen Rho und der Stimulation der Aktin-Polymerisierung und der Ausbildung von fokalen Adhäsionspunkten darstellen, da beide Effektoren auch die Phosphorylierung von überexprimierten ERM-Proteinen induzieren (Matsui, 1999). Eine der Rho-Kinase ähnliche Kinase ist die Citron-

Kinase, die wie Rho, ROCK und Dia in die Cytokinese involviert ist. Eine Aktivierung der Citron-Kinase führt jedoch nicht zur Ausbildung von Stressfasern (Madaule, 1998).

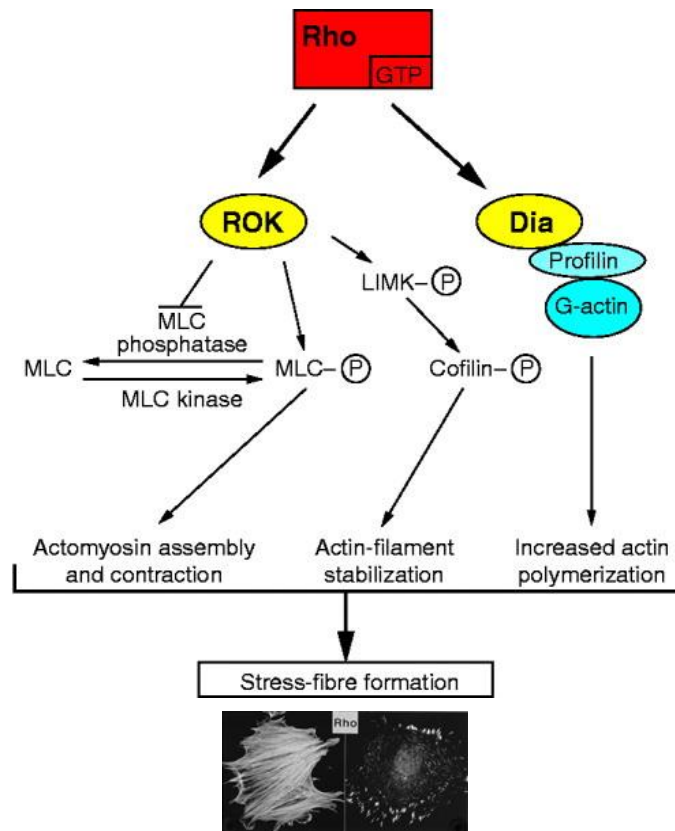


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Signalwege, die in die Rho-induzierte Stressfaserbildung involviert sind (Details siehe 1.2.2); verändert nach (Bishop, 2000)

1.2.2.1 Regulation der Phosphorylierung der MRLC in neuronalen Zellen durch RhoA und RhoB

Die meisten Studien der hier erwähnten Ergebnisse hinsichtlich der Regulation des Aktin-Cytoskeletts durch die Rho-GTPasen beziehen sich auf RhoA. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Myosin-Funktion über Rho-GTPasen zellspezifisch zu sein scheint. An PC12-Zellen wurde bewiesen, dass eine Aktivierung von RhoA zu keiner erhöhten MRLC-Phosphorylierung führt und sogar zu einer leichten, aber signifikanten Herabsetzung des Phosphorylierungs-Levels beiträgt. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu früheren Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen. Demnach führt eine Aktivierung von RhoB zu einer Erhöhung der MRLC-Phosphorylierung und eine Aktivierung von RhoA zum entgegengesetzten Effekt. RhoA und RhoB scheinen somit die Phosphorylierung der MRLC gegensätzlich zu beeinflussen. RhoB erhöht den Phosphorylierungsgrad der MRLC auch in neuronalen Zellen über einen ROK-unabhängigen Weg. Eine Aktivierung von RhoB führt in neuronalen Zellen zu einer Monophosphorylierung der MRLC an Ser19. Die Myosin-Phosphorylierung in Dendriten moduliert die NMDA-Rezeptor Sensitivität. Somit könnte

RhoB indirekt die Aktivität des NMDA-Rezeptors regulieren. RhoB reguliert des Weiteren den Vesikeltransport und das Recycling von Endosomen. Man geht davon aus, dass die Effekte von RhoA auf die Mikrotubuli ebenfalls in Neuronen und nicht-neuronalen Zellen unterschiedlich sind (Conway, 2004).

1.2.3 Regulation der Mikrotubuli durch Rho-GTPasen in nicht-neuronalen und neuronalen Zellen

In nicht-neuronalen Zellen führt eine Stimulation von RhoA über Dia1 zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli, wobei ein Signalweg von RhoA über die Rho-Kinasen nicht involviert ist. Die Aktivierung von Dia führt zu einem „Mikrotubuli-capping“, das zu einer Stabilisierung führt. Dia2 wird mit stabilisierten Mikrotubuli colokalisiert. Weiterhin kommt es zu einer Translokation der Mikrotubuli organisierenden Zentren (MTOCs), die durch Cdc42 reguliert wird (Hollenbeck, 2001). In neuronalen Zellen hingegen führt eine Bildung von Stressfasern über Rho zu einer Deassemblierung und somit zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli (Hirose M. , 1998).

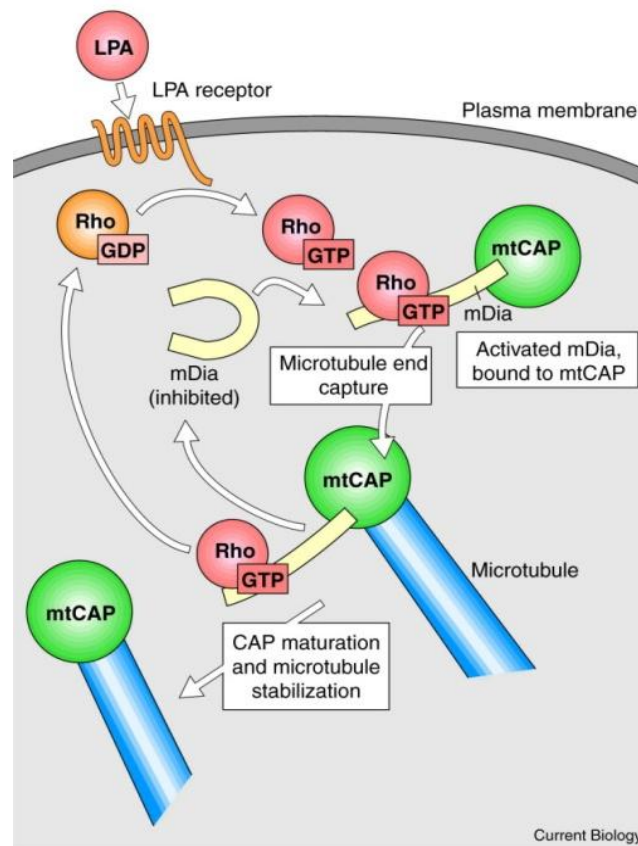


Abbildung 12: Möglicher Weg der Rho/mDia Stimulation, die zur Stabilisierung der Mikrotubuli in nicht-neuronalen Zellen führt. Lysophosphatidsäure (LPA) bindet an ihren Rezeptor und führt somit zur Aktivierung von RhoA. RhoA bindet an mDia, wobei die Autoinhibition aufgehoben wird. mDia interagiert dann wahrscheinlich mit einem Mikrotubuli-„capping-protein“ (mtCAP) oder „capping-protein“-Komplex. Dieses „capping“ führt dann zur Stabilisierung der Mikrotubuli. In neuronalen Zellen führt dieser Mechanismus zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli (Hollenbeck, 2001).

1.3 Neurosteroide

1.3.1 Biosynthese von Neurosteroiden

Das Gehirn ist neben Gonaden und Nebennieren ebenfalls ein steroidogenes Organ, das Steroide und steroidogene Enzyme synthetisieren kann. Die im Gehirn synthetisierten und dort auch wirksamen Steroide werden auch als Neurosteroide bezeichnet. Die Steroide DHEA (Dehydroepiandrosteron) und Pregnenolon, sowie deren Sulfatester sind schon längere Zeit als neuroaktiv bekannt. In den vergangenen Jahren konnte bewiesen werden, dass auch klassische Sexualhormone wie Estrogen, Testosteron und deren Metabolite neuroaktiv sind. Die Synthese von neuroaktiven Steroiden wird entwicklungsbedingt reguliert. Die Synthese und der Metabolismus von Neurosteroiden sind von der Expression und der Aktivität der steroidogenen Enzyme abhängig. Neurosteroide werden im zentralen und peripheren Nervensystem aus Cholesterin synthetisiert (siehe Abbildung 15). Die Steroidsynthese des Gehirns findet in Oligodendrozyten, Schwann Zellen, Typ I Astrozyten und Neuronen statt. Die steroidogenen Enzyme werden in den genannten Zelltypen unterschiedlich exprimiert. Sie lassen sich in P450- und Nicht-P450-Enzyme einteilen. Beide Gruppen kommen sowohl in Mitochondrien als auch in Microsomen vor. Steroidogene P450-Enzyme unterscheiden sich von anderen Cytochrom P450-Enzymen (Häm-bindende-Monooxygenasen) durch ihre hohe Substratspezifität (Compagnone, 2000).

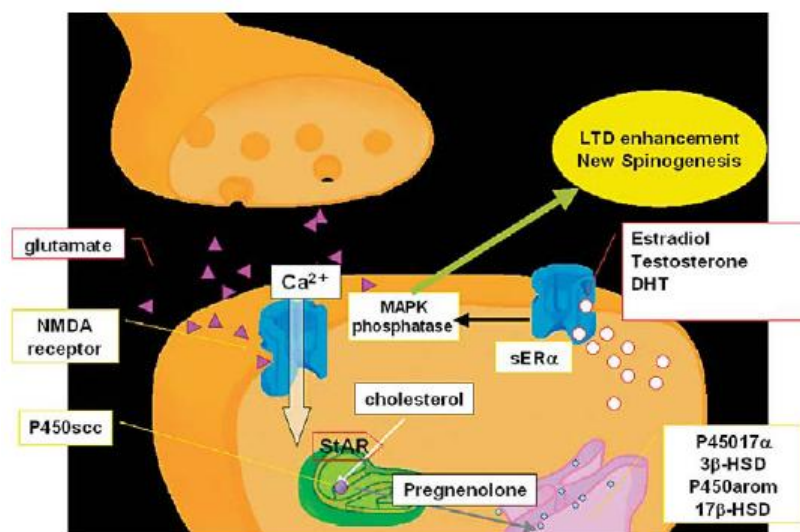


Abbildung 13: Schematische Darstellung der synaptischen Neurosteroidsynthese in Neuronen und die Modulation der synaptischen Signalübertragung durch Neurosteroide. Die Freisetzung von Glutamat durch die Präsynapse führt zu einem Ca^{2+} -Influx über den NMDA-Rezeptor. Dieser Ca^{2+} -Influx induziert den Transport von Cholesterin durch StAR oder den Peripheren-Benzodiazepin-Rezeptor (PBR) in die Mitochondrien. Dort wird Cholesterin durch die P450scc in Pregnenolon metabolisiert. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt dann die Umwandlung von Pregnenolon \rightarrow DHEA \rightarrow Androstendiol \rightarrow Testosteron \rightarrow Estradiol, oder Testosteron \rightarrow Dihydrotestosteron. Diese Reaktionen werden durch die P450(17 α), 3 β -HSD, 17 β -HSD, P450arom und 5 α -Reduktase katalysiert. Estradiol kann dann z.B. an einen synaptischen ER α binden und die entsprechenden Signalkaskaden stimulieren. Diese modulieren dann letztendlich AMPA- oder NMDA-Rezeptoren (Mukai, 2006).

Lange war man der Meinung, dass Astrozyten die aktivsten steroidogenen Zellen im Gehirn seien, da sie über den kompletten Satz steroidogener Enzyme verfügen. Astrozyten

exprimieren P450scc, P450c17, 3 β HSD, 17 β HSD und P450arom und synthetisieren Pregnenolon, Progesteron, DHEA, Androstendion, Testosteron, Estradiol und Estron. Des Weiteren wurde behauptet, dass Neuronen die gleichen Enzyme und Steroide aufweisen wie Astrozyten, mit Ausnahme von 17 β HSD und der Fähigkeit, Testosteron zu synthetisieren. Oligodendrozyten exprimieren P450scc und 3 β HSD und synthetisieren somit nur Pregnenolon, Progesteron und Androstendion. Man ging von einer differentiellen Steroidogenese aus, bei der sich alle drei Zelltypen gegenseitig ergänzen (Zwain, 1999). Neuste Studien belegen jedoch, dass Neuronen über den kompletten Satz steroidogener Enzyme verfügen und somit auch Testosteron synthetisieren können (Mukai, 2006). Die Aromatisierung von Androgenen und die 5 α -Reduktion von Progesteron und Androgenen stellen die 2 Hauptwege des Steroidmetabolismus im Gehirn dar.

1.3.2 Aromatase P450 (P450aro)

Die Aromatase P450 (P450aro) katalysiert die Umwandlung von Androgenen in Estrogene in speziellen Hirnregionen. Das am meisten zirkulierende Androgen Testosteron wird durch die P450aro in Estrogen umgewandelt. Die Aromatase P450 ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und in den Mitochondrien lokalisiert. Sie besteht aus zwei Komponenten, einem Cyt P450 (P450aro) Teil und dem ubiquitären Flavoprotein NADPH-Cytochrom P450-Reduktase. Von diesem Enzym gibt es gewebespezifische Isoenzyme. Im Säugerhirn wird die Aromatase ausschließlich in Neuronen exprimiert.

Die Aromatisierung von Androgenen zu Estrogenen findet im ER statt und wird als eine gemischte Oxidase-Reaktion klassifiziert. Die C₁₉-Steroide Testosteron und Androstendion besitzen einen ungesättigten A-Ring und dienen somit als Substrate für die Aromatase. Androstendion stellt im Vergleich zu Testosteron ein relativ schwaches Androgen dar. Das durch die Aromatisierung von Androstendion entstehende Estron ist im Vergleich zu Estradiol ein relativ schwaches Estrogen. Nach der Bindung des C₁₉-Androgens werden Reduktionsäquivalente vom NADPH über das Flavoprotein zum P450aro-Enzym weitergeleitet und Sauerstoff über drei Hydroxylierungen in das Substrat eingebaut. Während der Reduktion geht die Methylgruppe an C19 verloren und der A-Ring wird zu einem phenolischen Ring aromatisiert, wodurch es dann zur Bildung von Estrogenen kommt (Lephart, 2001).

1.3.3 5 α -Reduktase

Im Gegensatz zu P450 Aromatasen wandeln die 5 α -Reduktasen verschiedene Δ^4 , 3 Keto-Steroide (z.B Androgene, Progestagene und Glucocortikoide) in ihre 5 α -reduzierten Metaboliten um. Die höchste Affinität für die 5 α -Reduktase besitzt Progesteron und wird daher auch vor allen anderen bevorzugt umgewandelt. Die 5 α -Reduktase ist sowohl im ER als auch microsomal lokalisiert. Die 5 α -Reduktase katalysiert einen irreversiblen Transfer

von 2 H-Atomen von NADPH, der zu einer Reduktion der Doppelbindung 4-5 führt. Die irreversiblen Reduktionen von Testosteron und Progesteron führen zur Bildung von 5 α -Dihydrotestosteron und 5 α -Dihydroprogesteron. Diese reduzierten Metaboliten stellen bessere Substrate für die 3 α -Reduktion durch die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase dar.

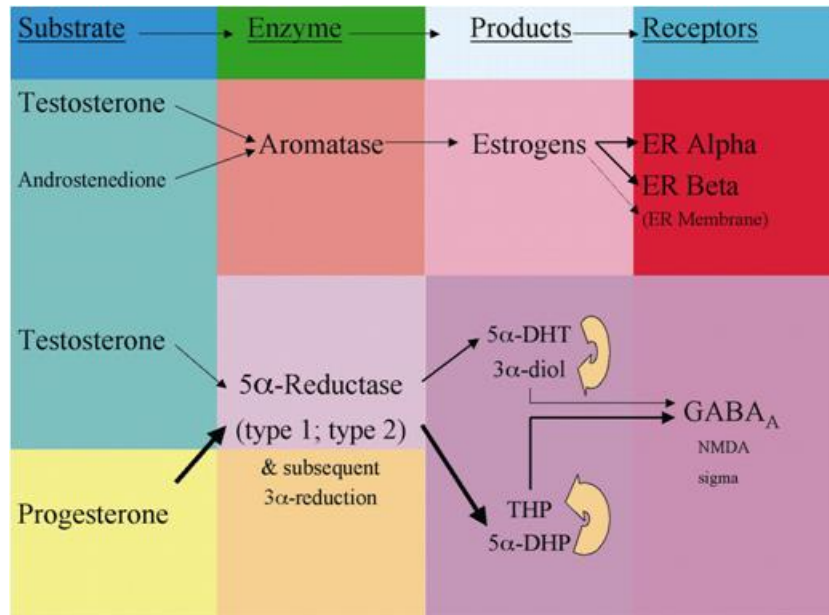


Abbildung 14: Substrate, Enzyme, Produkte und Rezeptoren, die in die Reaktionen der P450 Aromatase und 5 α -Reduktase involviert sind. Testosteron und Androstendion werden durch die P450 Aromatase in Estrogene umgewandelt, wobei Testosteron deutlich bevorzugt wird. Die 5 α -Reduktase wandelt Testosteron und Progesteron in 5 α -reduzierte Metaboliten (5 α -Dihydrotestosteron und 5 α -Dihydroprogesteron) um. Bei dieser irreversiblen Reaktion wird meist Progesteron bevorzugt. Diese reduzierten Metaboliten stellen dann bessere Substrate für die reversible 3 α -Reduktion durch die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase dar. Die 5 α - und 3 α -reduzierten Metaboliten von Progesteron induzieren hauptsächlich die Aktivität des GABA_A-Rezeptors (Lephart, 2001).

Die Reduktion der 5 α -reduzierten Metaboliten zu den 3 α -reduzierten Metaboliten ist reversibel. Die weitere Metabolisierung der 3 α -reduzierten Metaboliten führt dann über eine Sulfatierung und Glucaronylierung zu polaren Produkten, die vom Körper ausgeschieden werden (Lephart, 2001).

Neurosteroide lassen sich anhand ihres Synthesewegs in verschiedene Gruppen einteilen: Glucokortikoide (z.B. Cortisol, Cortison), Mineralcortikoide (z.B. Aldosteron), Gestagene (z.B. Progesteron), Androgene (z.B. DHEA, Testosteron) und Estrogene (z.B. Estradiol, Estron) (siehe Abbildung 15).

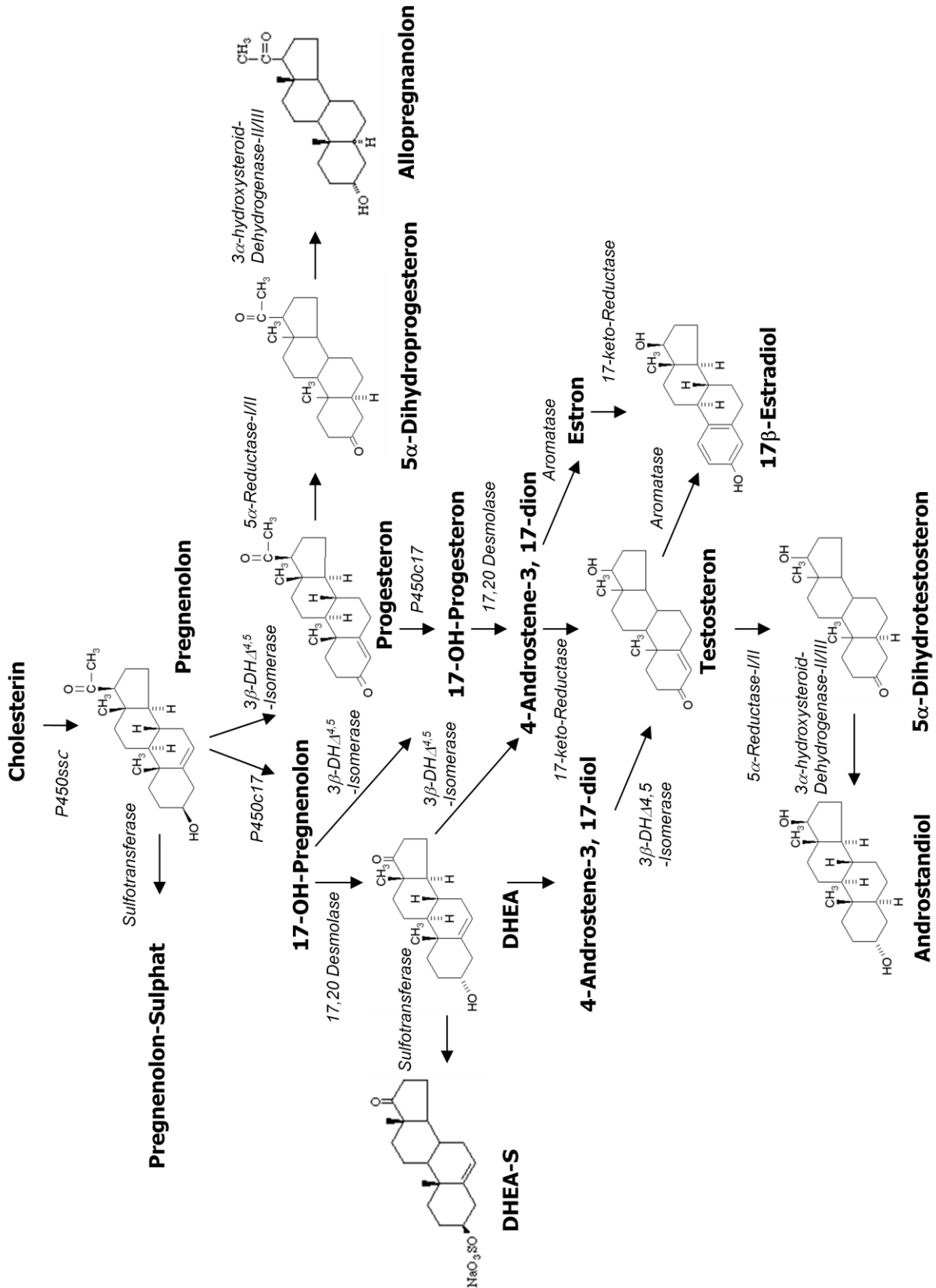


Abbildung 15: Ausschnitt aus den Biosynthese-Wegen von Neurosteroiden und die dazu gehörigen Enzyme.

1.3.4 Funktion von Neurosteroiden

Neurosteroidoide können langsame genomische und schnelle nicht-genomische Effekte zeigen. Die klassischen, genomischen Effekte von Steroiden beinhalten die Bindung an spezifische intrazelluläre Hormonrezeptoren, die die Charakteristik eines nukleären Transkriptionsfaktors aufweisen. Nach einer Homo- oder Heterodimerisierung wandern die Steroid-gebundenen Hormonrezeptoren in den Kern und binden dort an spezifische DNA-Steroidhormon-Elemente. Diese Bindung führt zu einer Induktion oder Repression zahlreicher Hormon-sensitiver Gene. Diese genomischen Effekte zeigen sich erst nach einer bestimmten Zeitphase, in der zusammengefasst folgendes abläuft: Hormon-Internalisierung, Rezeptorbindung, Dimerisierung, nukleäre Translokation, DNA-Bindung, Aktivierung/Deaktivierung von Zielgenen, Transkription, Translation und Proteineffekte/Sekretion.

In den letzten Jahren sind immer mehr schnelle Steroideffekte bekannt geworden, die sowohl über die klassischen (Estrogen-, Androgen- und Glucokortikoid-Rezeptoren), als auch über nicht-klassische Rezeptoren laufen (Nemere, 1998) (Jensen, 1996). Diese Effekte treten schon nach Sekunden bzw. nach wenigen Minuten auf, so dass es sich nicht um genomische Effekte handeln kann (Wehling, 1997). In verschiedenen Zelltypen, u.a. in hippocampalen Neuronen, konnte z.B. ein Estrogen-Rezeptor in der Plasmamembran identifiziert werden, der mit dem intrazellulären Estrogen-Rezeptor α strukturell identisch ist (Razandi, 1999) (Falkenstein, 2000). In anderen Studien wurden Estrogen-, Progesteron- und Glucokortikoid-Rezeptoren mit pharmakologischen Eigenschaften in der Plasmamembran identifiziert, die nicht den klassischen Rezeptoren entsprechen (Widstrom, 2004). Durch die Bindung der Steroide an diese Rezeptoren konnten Kurzzeit-Effekte wie Calcium-Mobilisierung (Estrada, 2006), Sekretion und cytoskelettale Modifikationen beobachtet werden (Kampa, 2004), die durch die Aktivierung von Signalmolekülen induziert wurden. Diese nicht-genomischen Effekte können jedoch auch die Transkription und die Proteinbiosynthese sekundär beeinflussen.

Es gibt Studien, die Interaktionen von klassischen Steroid-Rezeptoren mit Membran-assoziierten Proteinen belegen, die normalerweise durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Zu diesen Interaktionen gehören z.B. die Aktivierung des Src-PI3K-Akt-, Src-Ras-ERK- und MAPK-Signalwegs (siehe Abschnitt 1.3.6.1 und 1.3.6.2) (Simoncini, 2000) (Kousteni, 2001) (Kato, 2000). Im ZNS werden auch sehr viele Steroideffekte über Neurotransmitter-Rezeptoren vermittelt. Verschiedene Neurosteroidoide (z.B. Pregnenolon-Sulfat und DHEA-S) modulieren allosterisch z.B. die Aktivität von GABA_A-, NMDA- und Sigma-Rezeptoren (Plassart-Schiess, 2001).

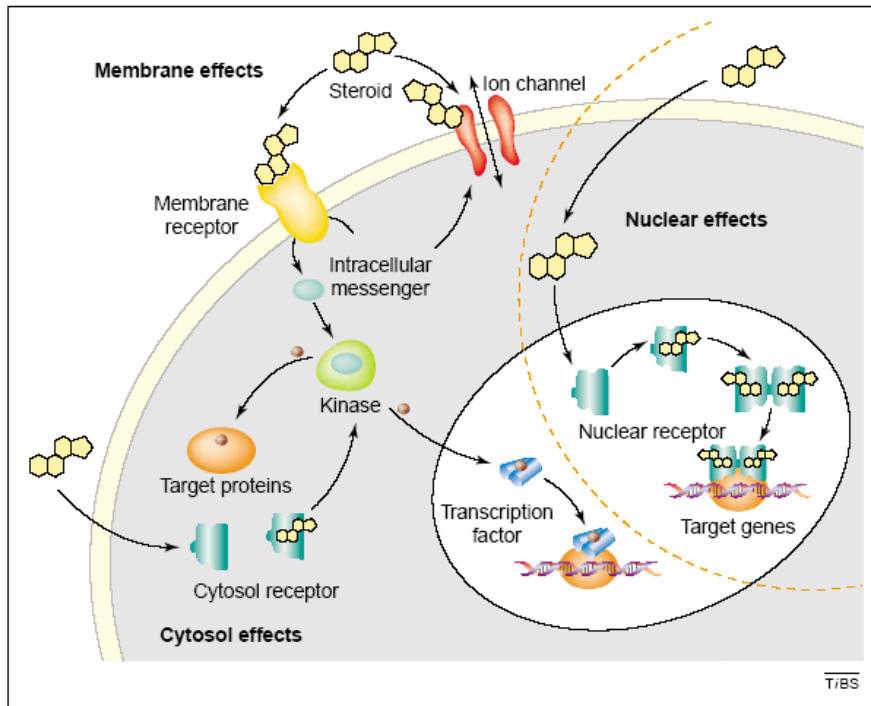


Abbildung 16: Steroide können an verschiedenen Orten der Zelle wirken: An der Plasmamembran, im Cytoplasma bzw. an cytosolischen Organellen und im Zellkern. Genomische Effekte werden durch die Bindung an nukleäre Rezeptoren ausgelöst, die die Transkription von Zielgenen beeinflussen. An der Plasmamembran können Steroidhormone an Ionenkanäle oder an Rezeptoren binden, die rasche, intrazelluläre Signalkaskaden einleiten. Diese Signalkaskaden beeinflussen neben verschiedensten Zielproteinen wiederum oftmals andere membranständige Rezeptoren und Ionenkanäle. Steroidhormone binden auch an cytosolische Rezeptoren, die die raschen Signalkaskaden modulieren und an Elemente des Cytoskeletts. Genomische und nicht-genomische Wege sind miteinander verbunden, da die raschen Signalkaskaden häufig auch Transkriptionsfaktoren modulieren. Verändert nach (Nadal, 2001)

1.3.5 DHEA (Dehydroepiandrosteron)

DHEA und sein Sulfatester DHEA-S sind die am häufigsten zirkulierenden Steroide im menschlichen Organismus und werden auch in hohen Konzentrationen vom Gehirn synthetisiert. DHEA(S) stellt ein wichtiges und kritisches Intermediat in der Androgen- und Estrogensynthese dar. DHEA-S ist ein Endmetabolit und kann durch Desulfation zurück in DHEA umgewandelt werden (Widstrom, 2004).

DHEA fördert die Gedächtnisleistung, wirkt anxiolytisch und aggressionshemmend und besonders im menschlichen Organismus antidepressiv. DHEA und DHEA-S schützen das Gehirn vor neurodegenerativen Erkrankungen und Ischemie. Die Mechanismen, die zur Neuroprotektion beitragen, sind noch weitgehend unbekannt (Baulieu, 1998) (Kaasik, 2003). Auf Rezeptor-abhängiger Basis können die Effekte von DHEA(S) in indirekte und direkte Effekte eingeteilt werden. Bei indirekten Effekten von DHEA(S) kommt es zu einer Weitermetabolisierung in aktive Metaboliten, die dann mit den entsprechenden Rezeptoren interagieren. Für DHEA(S) konnte noch kein spezifischer Rezeptor identifiziert werden. Bei den direkten Effekten von DHEA(S) kommt es zu veränderten biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran, Interaktion mit Ionenkanälen der Plasmamembran und

zur Veränderung von Enzymaktivitäten, die zu einer Aktivierung von intrazellulären Rezeptoren oder Plasmamembran-Rezeptoren führen (Widstrom, 2004).

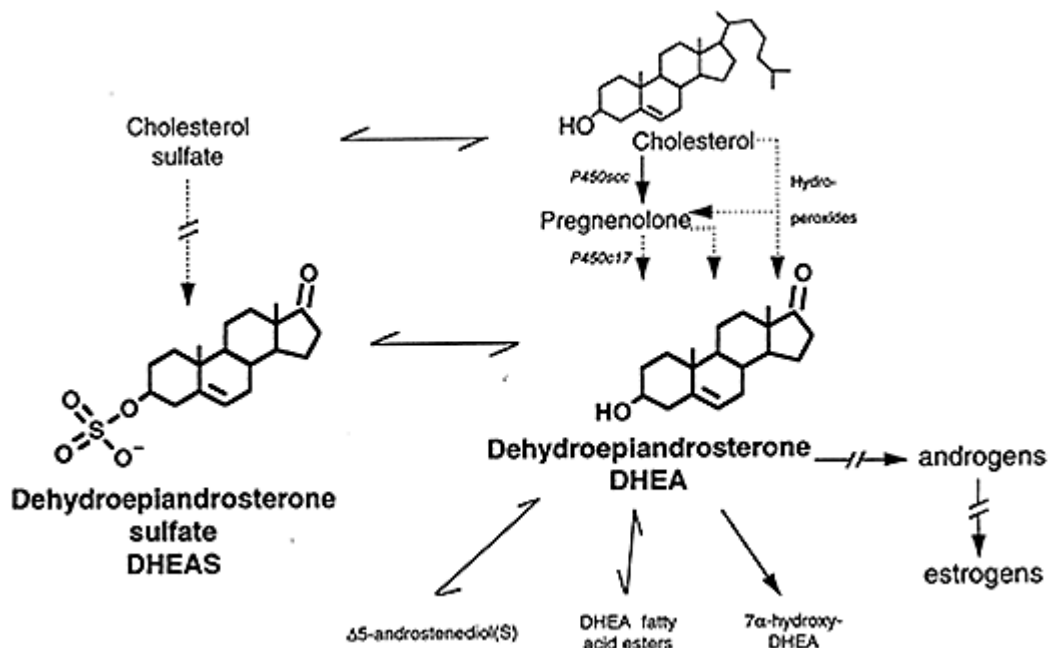


Abbildung 17: Schematische Darstellung des DHEA(S)-Metabolismus im Gehirn. DHEA wird hauptsächlich aus Cholesterin über Pregnenolon gebildet. Alternativ kann DHEA auch über Steroidhydroperoxide gebildet werden. DHEA wird dann reversibel in DHEA-S umgewandelt und stellt einen wichtigen Vorläufermetabolit von Sexsteroid-Hormonen dar (Baulieu, 1998).

1.3.5.1 Intrazelluläre DHEA-Rezeptoren

Für Rezeptor-abhängige Steroid-Effekte wurden bis heute meist nukleäre und cytosolische Rezeptoren charakterisiert. Diese Rezeptoren agieren als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren. Auch für DHEA(S) hat man in der Vergangenheit hauptsächlich nach cytosolischen und nukleären Rezeptoren (mit klassischen genomischen Effekten) geforscht. In murinen und humanen primären und immortalisierten Lymphozyten, humanen VSMC-Zellen, murinen B16 Melanoma-Zellen und Hepatozyten der Ratte konnten spezifische intrazelluläre DHEA-Bindungsstellen charakterisiert werden. Dabei wurde die subzelluläre Lokalisation von DHEA nicht geklärt. Die beobachteten Effekte könnten sowohl intrazelluläre Effekte als auch Bindungseffekte über die Plasmamembran beinhalten. Die Bindungsaffinitäten dieser putativen Rezeptoren liegen meist im gewöhnlichen physiologischen Bereich des humanen Organismus (6-43 nM; $K_d = 1,4-14$ nM).

Neben der Affinität der Bindungsstelle ist auch die Liganden-Spezifität eines physiologisch relevanten Rezeptors von höchster Bedeutung. Es gibt Studien zur Liganden-Spezifität, jedoch ist die Bandbreite an getesteten Steroiden sehr schmal. Die Bindung von DHEA an diese putativen intrazellulären Rezeptoren wird durch Glucokortikoide und Androgene inhibiert (Widstrom, 2004).

1.3.5.2 Plasmamembran-Rezeptoren für DHEA

Neben der Aktivierung von nukleären und cytosolischen Rezeptoren führen Steroide auch zu Plasmamembran-initiierten Effekten. Manche Plasmamembran-initiierten Effekte werden durch spezifische Rezeptoren der Plasmamembran hervorgerufen, die in ihrer DNA-Sequenz zu den nukleären Rezeptoren identisch sind (z.B. ER α und ER β) (Razandi, 1999). Der Membran-Progesteronrezeptor besitzt jedoch keine Homologie zum nukleären Progesteronrezeptor, er gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Widstrom, 2004).

In Arbeiten von Liu und Dillon wurde eine spezifische und hochaffine Bindungsstelle für DHEA identifiziert. Die Bindungsstelle konnte in ganzen Zellen, isolierten Plasmamembranen und isolierten Caveolae nachgewiesen werden. Die Ligandenbindung ist mit einer Aktivierung eines G-Proteins und der endothelialen NO-Synthase verknüpft. Die Aktivierung wurde auch durch DHEA-BSA, das nicht in die Zelle eindringen kann, nachgewiesen. Die DHEA-Konzentration für eine maximale Bindung und Aktivierung von intrazellulären Signalwegen beträgt 10 nM. Es gibt sehr wenige Daten über Gewebespezifitäten von DHEA-Bindungsstellen in Plasmamembranen. Plasmamembranen aus der Rattenleber und Herz zeigen z.B. nur 30 % der spezifischen DHEA-Bindung von BAEC-Membranen. Plasmamembranen aus der Rattenniere weisen hingegen keine Bindung von DHEA auf. Die Bindung wird nicht durch DHEA-S, Androstendion, 17 α -Hydroxypregnenolon, Testosteron oder 17 β -Estradiol inhibiert. Auch Inhibitoren von Estrogen-, Androgen-, Progesteron- und Glucokortikoid-Rezeptoren konnten die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase nicht inhibieren (Liu, 2004).

Es gibt viele Gemeinsamkeiten zwischen dem Membran-Estrogenrezeptor und dem putativen DHEA-Rezeptor. Beide Hormone aktivieren die endotheliale NO-Synthase über einen G-Protein gekoppelten Mechanismus (Liu, 2002). Inhibitoren des Estrogen-Rezeptors hemmen im Gegensatz zu Estradiol die Effekte von DHEA nicht (Liu, 2002) (Liu, 2004). Somit müssen sich die Rezeptoren voneinander unterscheiden. Es ist auch denkbar, dass die Effekte nicht von DHEA selbst, sondern durch Folgemetaboliten (z.B. 7-Hydroxy-DHEA, Androstendiol oder Androstentriol) induziert werden. Weitere Hinweise auf einen membranständigen Rezeptor geben die Arbeiten von Ioannis Charalampopoulos. Es konnte bewiesen werden, dass Neurosteroid wie DHEA, DHEA-S und Allopregnanolon sympathoadrenale Medulla Zellen vor Apoptose schützen, die durch Serumentzug induziert wurde. Bei sympathoadrenalen Medulla Zellen handelt es sich um Ganglion-artige Zellen, die eine wichtige Rolle in der Physiologie des peripheren sympathischen Nervensystems spielen. Dieser antiapoptotische Effekt wird über das antiapoptotische Bcl-2 Protein erzielt. Alle drei der oben genannten Steroide induzieren die Expression des Bcl-2 und des Bcl-xL Proteins. DHEA und Allopregnanolon modulieren die Genexpression des Bcl-2 Proteins sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebene und aktivieren die antiapoptotischen Transkriptionsfaktoren CREB und NF- κ B und die PKC α β -Kinase.

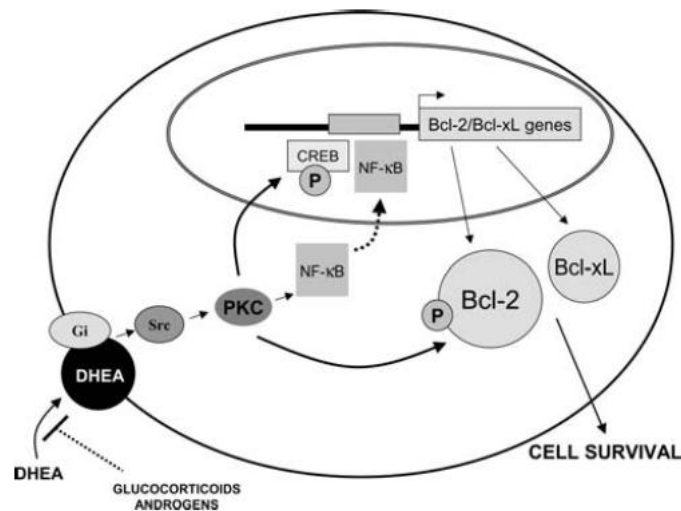


Abbildung 18: Möglicher Mechanismus der neuroprotektiven Wirkungsweise von Neurosteroiden. DHEA schützt neuronale Zellen vor Apoptose, indem es die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins auf transkriptioneller und posttranslativeller Ebene streng reguliert. Dabei soll DHEA an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor binden. Dies führt dann zu einer Aktivierung der Src und PKC. Die PKC aktiviert nachfolgend die Transkriptionsfaktoren NF-κB und CREB. Dies stimuliert die Expression von Bcl-2. Glucokortikoide und Androgene wirken als endogene Antagonisten von DHEA (Charalampopoulos, 2006).

Ein Defizit im noradrenergen System des Gehirns scheint eine große Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson oder dem Morbus Alzheimer zu spielen. Bei beiden neurodegenerativen Erkrankungen kommt es zu Modifikationen des noradrenergen Systems. Bei der Parkinsonschen Krankheit kommt es dadurch zu Veränderungen des dopaminergen Systems und bei Morbus Alzheimer zu einer Veränderung des basalkortikalen cholinergen Systems. Catecholamine unterstützen die neuronale Erneuerung bei neurodegenerativen Erkrankungen, in dem sie die Neuroplastizität, neurotrophische Faktoren (BDNF), die Neurogenese, Inflammation, den zellulären Energiemetabolismus und oxidativen Streß beeinflussen.

DHEA, DHEA-S und Allopregnanolon üben regulierende Effekte auf die Sekretion von Catecholaminen im Gehirn aus. DHEA, DHEA-S und Allopregnanolon erhöhen die Sekretion von Dopamin und Norepinephrin in PC12 Zellen. Dabei kommt es zu einer Deassemblierung des Aktinskeletts. Das Aktinskelett stellt ein schnell regulierbares Transportsystem für Catecholamin-Vesikel dar. Kommt es zu keiner Deassemblierung des Aktins, so wird auch die Steroid induzierte Catecholamin-Sekretion unterdrückt. Des Weiteren scheinen DHEA, DHEA-S und Allopregnanolon auch die de novo Synthese der Catecholamine zu beeinflussen.

Die physiologische Relevanz dieser Ergebnisse könnte darin begründet sein, dass mit zunehmendem Alter der DHEA-Spiegel rapide abfällt (siehe 1.3.5.5) und dies auch die de novo Synthese und Sekretion von Catecholaminen beeinflusst. Somit kann es zu altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen kommen. Die neuroprotektiven Effekte von DHEA, DHEA-S und Allopregnanolon werden vermutlich über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor vermittelt, wobei ein intrazellulärer Rezeptor nicht ganz

ausgeschlossen werden kann. Es wird angenommen, dass DHEA über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor die antiapoptotischen Kinasen Src und PKC aktiviert und diese wiederum zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Expression von Bcl-2 führen (Charalampopoulos, 2004) (Charalampopoulos, 2006).

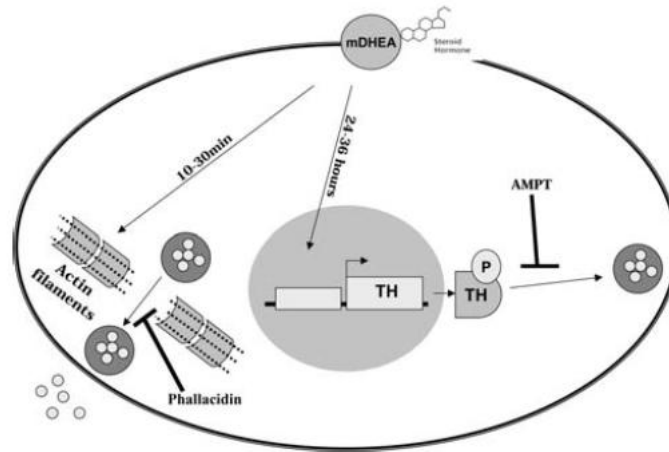


Abbildung 19: Hypothetisches Modell stimulatorischer Effekte von Neurosteroiden auf die Synthese und Sekretion neuroprotektiver Catecholamine. DHEA(S) und Allopregnanolon stimulieren direkt die Biosynthese und die Freisetzung neuroprotektiver Catecholamine. Diese Effekte werden wahrscheinlich durch einen direkten transkriptionellen Effekt auf die Tyrosin-Hydroxylase und die Regulation der Aktin-Depolymerisierung sowie der Aktinfilament-Assemblierung hervorgerufen. Phalloidin, ein Stabilisator des Aktinzytoskeletts inhibiert die Effekte von DHEA(S) und Allopregnanolon auf die Sekretion von Catecholaminen. AMPT, ein Tyrosin-Hydroxylase-Inhibitor hemmt den Effekt von Neurosteroiden auf die Biosynthese von Catecholaminen (Charalampopoulos, 2006).

1.3.5.3 Bindung von DHEA(S) an andere Steroidhormon-Rezeptoren

Studien mit gereinigten, rekombinanten ER- und AR-Rezeptoren zeigen eine Bindung von DHEA an diese Rezeptoren. Jedoch ist die Affinität von DHEA niedriger als die Affinität der eigentlichen Liganden zu ihrem Rezeptor. Auch die transkriptionelle Aktivierung von ER und AR erfordert eine höhere Konzentration von DHEA als die der eigentlichen Liganden (Widstrom, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass DHEA den ER β genauso stark aktivieren kann wie 17 β -Estradiol, jedoch auch eine höhere Konzentration von DHEA erfordert. Der ER α wird durch DHEA geringer aktiviert (Webb, 2006).

Estrogen-Rezeptoren sind in der Zellmembran, dem Zellkern und den Mitochondrien lokalisiert. Auch hier liegen verschiedene Mechanismen zu Grunde. So ist z.B. die Aktivierung des Caveolae-assoziierten ER G-Protein gekoppelt und unterscheidet sich sehr deutlich vom Mechanismus des klassischen nukleären ER (Evinger, 2005).

1.3.5.4 DHEA(S)-Bindung im Gehirn

DHEA und DHEA-S modulieren Membran-assoziierte Signalkaskaden im Gehirn. DHEA wird de novo in neuronalen Geweben gebildet und aktiviert oder inhibiert verschiedene

Neurotransmitter-Systeme über nicht-genomische Effekte. DHEA(S) interagiert mit dem GABA_A-Rezeptor, dem NMDA-Rezeptor und dem Sigma-Rezeptor. Für diese Rezeptoren wurde auch eine Interaktion mit anderen Steroiden nachgewiesen. DHEA bindet auch an Ionenkanäle im Gehirn (Widstrom, 2004). Neben der Bindung von DHEA an die oben genannten Rezeptoren und Ionenkanäle, gibt es auch eine hochaffine Bindung von DHEA an MAP2c (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2c, siehe 1.1.1), das ebenfalls eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung einnimmt (Laurine, 2003). Die Regulation von MAP2 durch Estradiol und Progesteron konnte bereits bewiesen werden (Plassart-Schiess, 2001). Dass Steroide direkt an cytoskelettale Elemente binden können, wurde am Beispiel von Pregnenolon demonstriert (Murakami K. , 2000). Auch für DHEA konnte eine Bindung an MAP2c bewiesen werden. Diese Bindung beinhaltet polare und hydrophobe Interaktionen und erfolgt hauptsächlich über den N-Terminus von MAP2c. Die Struktur des N-Terminus ist charakteristisch für MAP2-Isoformen und fehlt in anderen MAPs und auch Tau, das in neurodegenerative Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer involviert ist.

Die Bindung von DHEA an MAP2c erfolgt über eine hydrophobe Tasche, wie sie Steroid-bindende Dehydrogenasen besitzen. Bei dieser Bindung sind sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus beteiligt, wobei der C-Terminus die Tasche verschließt. Das Steroid wird über hydrophobe Interaktionen und Wasserstoffbrücken-Bindungen in der Tasche orientiert. Die Fixierung von MAP2c durch Tubulin erhöht die Steroid-Bindungsstellen im Protein. Steroide können MAP2 stabilisieren und somit auch modulieren.

MAP2 interagiert mit zahlreichen Proteinen der Signaltransduktionswege, z.B. Src, Grb2 oder auch der PKA. Die Interaktion von MAP2 mit der PKA moduliert den Phosphorylierungsstatus von MAP2. Diese Modulation wirkt sich somit auf die Dynamik der Mikrotubuli und die Morphologie aus. Die PKA-Bindungsdomäne und die DHEA-Bindungstasche von MAP2 überlagern sich, eine Bindung von DHEA kann somit die Aktivität der PKA inhibieren. Man vermutet, dass auch MAPs mit hohem Molekulargewicht DHEA binden können, da alle sechs Regionen, die die DHEA-Bindungstasche bilden, in allen hochmolekularen Isoformen konserviert sind. Eine Steroidbindung ist sowohl für die fetalen (MAP2c) als auch für die adulten MAP-Isoformen (MAP2a+b) sehr wichtig. Auch die Expressionsrate wird durch Steroide wie Estradiol oder Progesteron moduliert. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau bindet keine Steroide, da die N-terminale Bindungsregion fehlt. In verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, z.B. dem Morbus Alzheimer kommt es zur Ausbildung von sogenannten fibrillären Tangles durch das Protein Tau. MAP2 bildet keine fibrillären Tangles aus. Dies könnte durch den Unterschied in der N-terminalen Sequenz von MAP2 und Tau begründet sein. Es konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von Tau bei der Ausbildung von fibrillären Tangles eine wichtige Rolle spielt. Die Bindung von Steroiden an den N-Terminus von MAPs könnte somit einen schützenden Effekt gegen die Bildung von fibrillären Tangles ausüben (Laurine, 2003). Ishizuka konnte auch eine Bindung von DHEA an aufgereinigter PKC nachweisen, die jedoch in vitro nicht bestätigt wurde (Ishizuka, 1999).

1.3.5.5 Physiologische und pharmakologische Konzentrationen von DHEA

In seiner sulfatierten Form ist DHEA das im Menschen am höchsten konzentrierte Steroid. Während der fetalen Entwicklung beträgt der Plasmaspiegel von DHEA(S) 3-7 μM , fällt dann aber nach der Geburt stark ab und bleibt bis zum 6. Lebensjahr niedrig. Dann kommt es zu einem rapiden Anstieg der DHEA-Konzentration im Plasma. Die Konzentration von DHEA erreicht um das 20. Lebensjahr ihr Maximum und pendelt sich auf eine Konzentration von 10 μM für Männer und 5 μM für Frauen im 3. Lebensjahrzehnt ein. Mit fortschreitender Alterung fällt der DHEA-Spiegel dann um durchschnittlich 2% pro Jahr ab. Im Alter von ca. 70 Jahren beträgt der DHEA-Spiegel dann weniger als 20% seines Maximums. Verantwortlich für den starken Abfall im Alter soll eine Verringerung der 17,20-Lyase-Aktivität sein. Diese drastischen Veränderungen konnten für andere Steroide nicht beobachtet werden (Rainey, 2004). Im Gegensatz zum Abfall der DHEA-Konzentration steigt die Konzentration von Cholesterin im Serum mit zunehmendem Alter an. Es wurde beobachtet, dass der Konzentrationsabfall von DHEA und der Anstieg von Cholesterin invers sind (Barret-Connor, 1999).

1.3.6 Testosteron

Bei Testosteron handelt es sich um ein Androgen. Androgene regulieren die Ausprägung primärer und sekundärer männlicher Geschlechtsmerkmale. Klassische Hauptsyntheseorte sind neben den Hoden die Nebennierenrinde und die Ovarien.

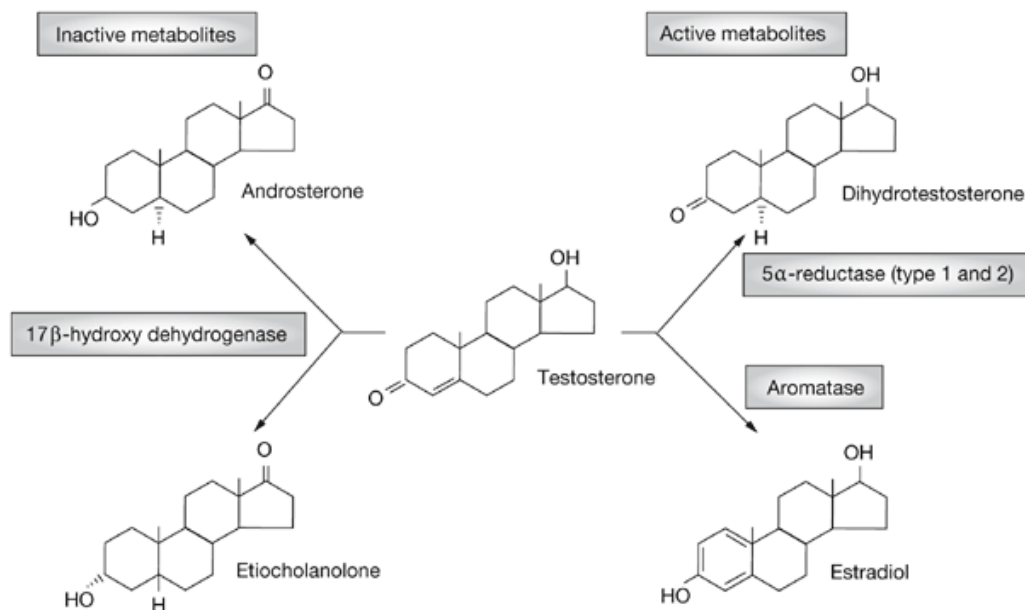


Abbildung 20: Testosteron kann in stoffwechselaktive und inaktive Metaboliten umgewandelt werden. 17 β -Estradiol und 5 α -Dihydrotestosteron stellen die stoffwechselaktiven Metaboliten dar, wobei in Neuronen die Metabolisierung in 17 β -Estradiol durch die P450 Aromatase bevorzugt abläuft. Androsteron und Etiocholanolon stellen die inaktiven Metaboliten des Testosterons dar und werden beide durch die 17 β -Hydroxy-Dehydrogenase metabolisiert. Dieser Synthese-Weg spielt stoffwechselphysiologisch praktisch keine Rolle (Sirinivas-Shankar, 2006)

Die aus den Hoden von Säugetieren isolierten Androgene zeigen artspezifische Unterschiede. Bei Mensch, Hund und Schwein findet man in hohen Mengen sulfatierte Zwischenprodukte. Die klassisch stoffwechselaktive Form des Testosterons ist das 5 α -Dihydrotestosteron, das durch 5 α -Reduktase-Aktivität in peripheren Organen synthetisiert wird.

Die Testosteron-Synthese ist nicht nur auf die Gonaden beschränkt, sondern findet auch im Gehirn statt. Astrozyten und Neuronen können, im Gegensatz zu Oligodendrozyten, Testosteron synthetisieren, indem sie Androstendion zu Testosteron umwandeln. Neuronen sind in der Metabolisierung von Testosteron zu Estradiol sehr aktiv (Mukai, 2006) (Zwain, 1999).

1.3.6.1 Nicht-genomische Effekte über den intrazellulären Androgen-Rezeptor

Die Androgen-, Progesteron- und Estrogen-Rezeptoren α/β interagieren mit der intrazellulären Tyrosin-Kinase c-Src und aktivieren diese (Kousteni, 2001) (Migliaccio, 2000). Die c-Src ist durch Myristoylierung und Palmitoylierung an die Plasmamembran gebunden. Die Aktivität der c-Src ist über eine Interaktion der Tyrosin-Kinase-Domäne und der Src-Homologie-Domäne 2 und 3 autoinhibiert. Eine Unterbrechung dieser Interaktion durch bindende Proteine oder Phosphorylierung an der SH2-Domäne führt zu einer Aktivierung der c-Src-Kinase (Heinlein, 2002). Ein Effektor der c-Src ist das Adapterprotein Shc, das den MAPK-Weg reguliert. Die c-Src induzierte MAPK-Aktivierung ist in Migrations-, Proliferations- und Differenzierungs-Prozesse involviert (Schlessinger, 2000). Die physiologische Rolle der Aktivierung des MAPK-Wegs durch Androgene ist noch nicht vollständig geklärt. In LNCaP-Zellen führt eine Aktivierung des MAPK-Wegs zu einem Abbruch des Zellzyklus (Migliaccio, 2000). Ob es sich bei diesen Effekten um genomische oder nicht-genomische Effekte handelt, ist nicht eindeutig zu klären, da sie in einem größeren Zeitfenster auftreten. Es ist möglich, dass die nicht-genomischen Effekte des AR die Transkriptions-Aktivität beeinflussen, da die Aktivität des AR von AR-Koaktivatoren durch direkte Phosphorylierung der MAPK moduliert wird (Heinlein, 2002).

Ein anderes Androgen bindendes Protein ist SHBG. Bei SHBG handelt es sich um ein Serum-Protein. Im Serum sind die meisten Steroidhormone (96-99,5%) mit Serum-Proteinen komplexiert. An der Zelloberfläche verschiedener Gewebe konnte ein SHBG-Rezeptor identifiziert werden. Bei diesem Rezeptor handelt es sich wahrscheinlich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Androgene und auch Estradiol erhöhen über SHBG und den SHBG-Rezeptor den cAMP-Spiegel in der Zelle. In Prostata- und Brustkrebs-Zellen induziert die Erhöhung des cAMP-Spiegels über SHBG eine Aktivierung der PKA. Die PKA erhöht die Transkriptions-Aktivität des AR durch eine erhöhte Interaktion von AR-Coregulatoren mit dem AR, die durch eine Phosphorylierung der Coregulatoren durch die PKA stimuliert wird (Heinlein, 2002).

Zusammengefasst führen ein veränderter Phosphorylierungsstatus des AR und dessen Coregulatoren zu einer veränderten Transkriptions-Aktivität des AR.

1.3.6.2 Membran-Androgen-Rezeptoren

In jüngster Zeit wurde von einigen Arbeitsgruppen die Existenz eines Androgen-Membran-Rezeptors postuliert. In verschiedenen Zelltypen (Leber/Prostata) führt eine Zugabe von Testosteron zur Modulation von Ionen-Kanälen und cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, ob diese Effekte über einen Membran-ständigen Androgen-Rezeptor, SHBG oder c-Src-Kinase-AR-Komplex laufen, da dieser putative Membran-Rezeptor noch nicht identifiziert werden konnte. Die durch Testosteron erzielte Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels wird durch einen G-Protein gekoppelten Mechanismus (in T-Zellen) induziert.

In LNCaP-Zellen und Sertoli-Zellen konnte auch eine Androgen-induzierte Stimulation von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen beobachtet werden (Falkenstein, 2000). Ca^{2+} fungiert als ubiquitärer second messenger und die Modulation des intrazellulären Ca^{2+} -Levels reguliert Zellprozesse wie Proliferation, Apoptose, Motilität und Genexpression. Eine Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels wird durch Sensormoleküle wie die PKC und Calmodulin detektiert und induziert dann bestimmte Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren.

In LNCaP-Zellen identifizierte man einen Signalweg, in der eine Aktivierung eines Membran-Testosteron-Rezeptors zu einer Reorganisation des Aktin-Cytosketts führt. Dabei kommt es zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der FAK (focal adhesions kinase). Die FAK ist eine Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die in fokalen Adhäsionspunkten lokalisiert ist. Zusätzlich zu Integrinen, die die Adhäsion von Zellen zur extrazellulären Matrix vermitteln, führen extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Steroidhormone, Cytokine und Neuropeptide zu einer Tyrosin-Phosphorylierung und Aktivierung von FAK.

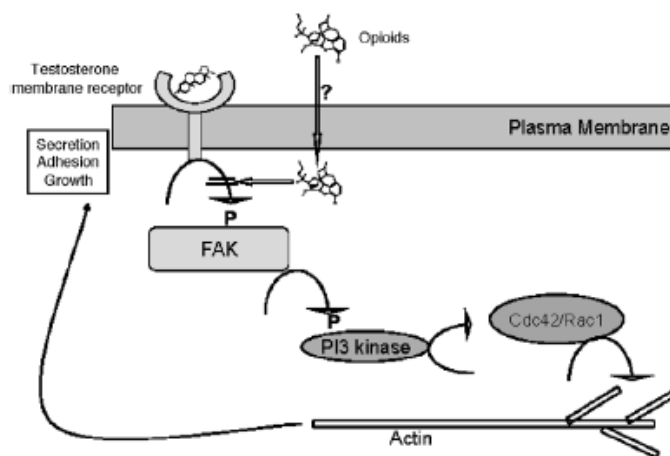


Abbildung 21: Modell für die durch Testosteron induzierte Reorganisation des Aktinskeletts. Testosteron bindet an einen Membran-Rezeptor und es kommt zu einer Phosphorylierung von FAK. Die aktivierte FAK phosphoryliert und aktiviert dann die PI3-Kinase. Im nächsten Schritt kommt es zu einer Aktivierung von Cdc42/Rac1. Es kommt dann zur Polymerisierung von Aktin, dass zur Sekretion von PSA und einem erhöhten Wachstum führt. Opioiden inhibieren den durch Testosteron ausgelösten Signalweg über eine Inhibition der FAK (Kampa, 2004).

FAK scheint auch eine Rolle bei der Entwicklung von Tumoren zu spielen und wird daher als Onkogen bezeichnet. Die Aktivierung von FAK führt zu einer Assoziation an die PI3-Kinase und somit zu ihrer Aktivierung. Die PI3-Kinase aktiviert dann im nächsten Schritt Cdc42 und Rac1, wobei es letztendlich zu einer Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts kommt (Papakonstanti, 2003).

1.3.6.3 Testosteron-induziertes Neuriten-Wachstum

Neueste Studien belegen, dass ein durch Testosteron verursachter schneller intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg in neuronalen Zellen zum Auswachsen von Neuriten führt. Diese Ca^{2+} -Signale werden über einen Plasmamembran-Rezeptor (G-Protein gekoppelten Rezeptor) verursacht und sind von einem Zusammenspiel zwischen einem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -sensitiven Ca^{2+} -Pool und einem Ca^{2+} -Influx aus dem extrazellulären Medium abhängig (Estrada, 2006).

Ebenso wie Testosteron induziert auch 17β -Estradiol Ca^{2+} -Signale, die sich aber zeitlich von den Testosteron-induzierten Signalen unterscheiden. Eine durch die Aromatase bewirkte Umwandlung von Testosteron in 17β -Estradiol und dadurch verursachte Estradiol abhängige Induktion von Ca^{2+} -Signalen konnte ausgeschlossen werden (Losel, 2003).

Die Existenz eines Plasmamembran-Rezeptors für Androgene wurde bisher für neuronale Zellen nicht bestätigt. Die oben genannten Ergebnisse weisen erstmalig auf ein solches Modell in neuronalen Zellen hin. Ca^{2+} -Signale sind essentiell für Migrationsprozesse, Differenzierung und Neuritenwachstum in neuronalen Zellen. Auch in PC12 Zellen wurde ein Androgen-induziertes Auswachsen von Neuriten beobachtet (Lustig, 1994). Als Grundlage dieser Effekte wurde eine Aktivierung des iAR angenommen, die zugrunde liegenden second messenger blieben jedoch unbekannt. Die initialen Schritte für das Auswachsen von Neuriten werden in SH-SY5Y-Zellen durch die PKA und PI3-Kinase beeinflusst (Sanchez, 2001). Auch eine Stimulierung des ERK-Signalwegs führt zu neuronalem Wachstum und erhöhter Viabilität. In Neuronen können diese Kinase-Signalwege durch intrazelluläre Ca^{2+} -Signale stimuliert und moduliert werden (Doherty, 2000). Diese Tatsache könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein Testosteron induziertes Ca^{2+} -Signal ein Schlüsselregulator dieser Abläufe ist. Dennoch scheint auch der iAR eine wichtige Rolle zu spielen, da auch eine Erhöhung des nucleären Ca^{2+} -Spiegels für ein Maximum an Neuritenwachstum essentiell ist. Androgene stimulieren die Differenzierung verschiedener neuronaler Zelltypen über den iAR und die Genexpression. Die nicht-genomischen Effekte könnten eine physiologische Rolle vor der Aktivierung des iAR spielen. Eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration könnte die Bindung der Androgene an ihren Rezeptor stimulieren. Diese Bindung könnte dann Ca^{2+} -abhängige Signalwege wie ERK, PI3-Kinase oder Src aktivieren, die dann den iAR phosphorylieren und seine Aktivität erhöhen (Estrada, 2006). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die genomischen und nicht-genomischen Effekte miteinander gekoppelt sind.

Ausgehend von den Apoptose-Studien an PC12 Zellen der Arbeitsgruppe von Ioannis Charalampopoulos, wird vermutet, dass Testosteron und DHEA ähnliche Membran-Bindungsstellen besitzen. Testosteron zeigte eine 10-15 fach schwächere Bindung an die DHEA-Bindestelle als DHEA und eine antiapoptotische Wirkung blieb völlig aus. Des Weiteren wurde der antiapoptotische Effekt von DHEA durch Testosteron oder DHT völlig inhibiert. Daher nimmt man an, dass es sich bei DHEA und Testosteron um endogene Antagonisten handelt, die um eine gemeinsame Bindungsstelle konkurrieren (Charalampopoulos, 2006).

1.4 Ziele der Arbeit

Bis zum heutigen Stand der Forschung ist keine systematische Analyse der morphologischen Effekte von Neurosteroiden auf das neuronale Cytoskelett sowie der involvierten Signalkaskaden bekannt. Auch ist für die meisten Steroide nicht bekannt, über welche Rezeptor-Typen (intrazelluläre Rezeptoren, Plasmamembran-ständige Rezeptoren) sie agieren. Ebenfalls noch weitgehend unerforscht ist der Transport von Steroiden in die Zelle und deren subzelluläre Lokalisation.

Während meiner Diplomarbeit habe ich eine systematische Analyse der morphologischen Effekte von Neurosteroiden auf das Cytoskelett neuronaler Zellen in Abhängigkeit des Differenzierungsstatus durchgeführt. Die für diese Studien verwendeten Steroide umfassten die Klassen der Gestagene, Androgene und Estrogene. Es zeigte sich sehr deutlich, dass jedes dieser untersuchten Steroide einen eigenen, charakteristischen Effekt auf das Cytoskelett, insbesondere auf die Mikrotubuli, aufweist und es entweder zu einem Stabilisierungs- oder Destabilisierungseffekt kommt. Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es sich bei den beobachteten Effekten um schnelle, nicht-genomische Effekte handelt und dass bestimmte Steroide in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades zu Folgemetaboliten umgewandelt werden¹.

Ziel dieser Dissertation ist es, die Effekte der Steroide DHEA und Testosteron auf das Cytoskelett neuronaler Zellen näher zu untersuchen. Aus dieser Zielstellung ergeben sich drei Themenkomplexe:

1) Durch die Inhibierung der Metabolisierung zu den entsprechenden Folgemetaboliten sollen die charakteristischen morphologischen Effekte von DHEA und Testosteron auf das Cytoskelett eindeutig diesen Steroiden zugewiesen werden

2) Die biochemischen Ursachen der beobachteten Veränderungen des Cytoskeletts sollen für beide Steroide aufgeklärt werden. Diese Untersuchungen beinhalten eine systematische

¹ Diplomarbeit „Der Einfluss von Neurosteroiden auf die Mikrotubuli von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen“; Susanne Lemcke (2004)

Aufklärung der Effekte von DHEA und Testosteron auf das Aktinskelett und eine Untersuchung der möglichen involvierten Signalkaskaden. Die Fokussierung erfolgt dabei auf die Signalwege der Rho-GTPasen (Rho/Rac/Cdc42), da sie die Hauptregulatoren des Aktinskeletts darstellen.

3) Die Aufklärung des Transports und der subzellulären Lokalisation von DHEA und Testosteron und eine damit verbundene Eingrenzung möglicher molekularer Interaktionspartner. Dieser Sachverhalt soll mit Hilfe der von mir synthetisierten, funktionalen, fluoreszierenden Steroidhormonderivate geklärt werden. Diese Steroidhormonderivate sollen die Möglichkeit geben, den Transport und den zellulären Wirkungsort von DHEA und Testosteron sowohl an fixierten als auch an lebenden Zellen aufzuklären.

Die Aufklärung der Effekte dieser Steroide auf Neuronen stellt ein wichtiges Kriterium dar. Hiermit ergeben sich wichtige Aspekte hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen, deren Ursache in einer fehlregulierten Neurosteroidogenese oder Aktincytoskelett-Reorganisation liegen, und einer ständig fortschreitenden Vermarktung von DHEA und die Anwendung von Testosteron im Bereich der Anabolika.

2.1. Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Analysenwaage	Mettler-Toledo GMBH, Gießen
Blot-Apparatur (semy-dry-Verfahren)	BioRad
CCD-Kamera	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt
CO₂- Brutschrank für Zellkultur („MCO-17AI“)	Sanyo, Breda (Niederlande)
Cryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Deckgläschen (10 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Doppelstrahlphotometer Hitachi U-200	Colora Meßtechnik GmbH, Lorch
Eppendorf-Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Flachbettgelapparatur für DNA	Eigenbau
Fluoreszenzmikroskop („Axiovert S100“)	Zeiss, Jena
FluoStarOptima BMG	BMG Labtechnologies Durham, NC (USA)
Gewebekulturschale (10 und 3,5 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschalen (24 und 96 Well)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Heizblock Fisher Bioblock	Fisher Bioblock Scientific, Illkirch Cedex (F)
HPTLC Fertigplatten „Kieselgel 60 F254“	Merck, Darmstadt
Hyperfilm	Amersham Life Science, Braunschweig
Inkubationsschüttler MULTITRON	Infors GmbH, Einsbach
Tischkühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Lumineszenzmessplatten Lumitrac (96-well-Platte)	Greiner, Frickenhausen
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Minigel-Elektrophorese	Biometra, Göttingen
Netzgeräte für Gelelektrophorese	Biometra, Göttingen
Nitrocellulosemembran „Hybond–C Extra“	Amersham Biosciences, UK
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, Fernwald

Laborgeräte	Hersteller
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg Gilson, Middleton, WI (USA)
Polystyrolküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Rotationsverdampfer Rotavapor R134	Fa. Büchi, Schweiz
Sicherheitswerkbank („Hera Safe“)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thoma-Zählkammer (0.1 mm x 0.04 mm ²)	Brandt, Wertheim
Tischzentrifuge: Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge („Rotina 46“) für Zellkultur	Hettich, Tuttlingen
Überkopfschüttler	Fröbel Labortechnik, Lindau
Ultraschallgerät	Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Vortexer	Janke und Kunkel, Heitersheim
Wasserbad	B. Braun, Melsungen
Whatman-Papier	Bender & Hobein, Bruchsal

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel	Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen AppliChem, Darmstadt Fluka, Neu-Ulm Milipore, Eschborn
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniummolybdat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxydisulfat)	Sigma, Deisenhofen
Bactoagar	AppliChem, Darmstadt
Bacto-Trypton	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (bovine serum albumin)	Roth, Karlsruhe

Chemikalien	Hersteller
Bodipy® (D2390)	Molecular Probes
CDPStar	Applied Biosystems, Bedford, MA (USA)
DMF (Dimethylformamid)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimehylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma, Deisenhofen
EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat)	Sigma, Deisenhofen
Entwickler für Hyperfilm	AGFA,
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fixier für Hyperfilm	AGFA,
Geneticin (G418)	PAA, Cölbe
Glucose	AppliChem, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
I-Block	Tropix, Bedford, MA (USA)
Lipofectamine2000	Invitrogen, Paisley (UK)
Luciferase-LARII-Puffer	Promega, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schwei
Mowiol	Calbiochem, Bad Soden
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
2,3,4,5,6-Pentafluorophenol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
RotiQuant	Roth, Karlsruhe
SDS (sodium dodecyl sulfate)	BioRad, München
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat	Pierce, Rockford; IL
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma, Deisenhofen
TritonX-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Chemikalien	Hersteller
Trypsin	PAA, Linz, Österreich

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primärantikörper

Antikörper	WB	IF	Hersteller
Anti-Aktin (Kaninchen)	1:1000 in I-Block	---	Sigma, Deisenhofen
Anti-DHEA (Kaninchen)	---	1:100 in PBS/5% FCS	Sigma, Taufkirchen
Anti-Histon Deacetylase 1 (Kaninchen)	1:1000 in I-Block	---	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Myosin IIA (Kaninchen)	1:1000 in I-Block	1:500 in PBS/5% FCS	Sigma, Taufkirchen
Anti-Myosin light chain (Maus)	1:250 in I-Block	1:100 in PBS/5% FCS	Sigma, Taufkirchen
Anti-Phosphoserin-19 (Kaninchen)	1:100 in 3% BSA/TBST	---	Santa Cruz
Anti-Vinculin (Maus)	--	1:400 in PBS/5% FCS	Sigma, Taufkirchen
Anti- α -Tubulin (Maus)	---	1:2000 in PBS/5% FCS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.3.2 Sekundärantikörper

Antikörper	WB	IF	Hersteller
Alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Maus IgG	1:8000 in I-Block	---	Tropix, Bedford, MA; USA
Alkalische Phosphatase Gekoppelter Anti-Kaninchen IgG	1:8000 in I-Block	---	Tropix, Bedford, MA; USA
Anti-Kaninchen IgG-Cy3 Konjugat	---	1:500 in PBS/5% FCS	Sigma, Taufkirchen
Anti-Maus IgG-Cy3 Konjugat	---	1:500 in PBS/5%FCS	Sigma, Taufkirchen

Antikörper	WB	IF	Hersteller
Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus IgG	1:3000 in 3% BSA/TBST	---	Pierce, Rockford; IL
Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen IgG	1:3000 in 3% BSA/TBST	---	Pierce, Rockford; IL
Phalloidin-FITC	---	5 µg/ml in PBS/5% FCS	

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedien und Zusätze	Hersteller
DMEM Komplettmedium High Glucose (ohne Phenolrot)	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum Gold	PAA, Cölbe
Geneticin (G418)	PAA, Cölbe
Glutamin	PAA, Cölbe
Ham's F12 Medium	Sigma, Deisenhofen
Lipofectamine2000	Invitrogen, Paisley (UK)
Minimum Essentiell Medium (MEM)	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	PAA, Cölbe
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Paisley (UK)

2.1.5 Häufig verwendete Puffer, Stammlösungen und Zellkulturmedien

2.1.5.1 Puffer

HBS: 10 mM HEPES (pH = 7.4); 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,5 mM MgCl₂

I-Block: 1xPBS; 0,2% I-Block, Tropix (w/v); 0,1 % Tween20 (w/v)

Laufpuffer für Gel-Elektrophorese:	0,2% SDS; 28,9 g/l Glycin; 6 g/l Tris pH= 8,9 bei RT
Puffer für Mikroskopie:	für Mikroskopie mit SH-SY5Y-Zellen; DMEM F-12 Hams Medium mit 1% Glutamin, 1% Streptomycin, ohne FCS
PBS:	8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
TBS:	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl
Solubilisierungspuffer:	1% SDS; 1 mM EGTA; 50 mM NaF; 10 mM Sodium pyrophosphate; 0,2 mM Sodium orthovanadate; 14 mM 2-mercaptoethanol
SDS-Probenpuffer:	3% (w/v) SDS; 200 mM DTT; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 20% (w/v) Glycerin; 0,01% (w/v) Bromphenolblau
DNA-Probenpuffer:	50% (v/v) Glycerin; 0,2% (v/v) SDS; 0,05% Bromphenolblau; 0,05% Xylencyanol; 10 mM EDTA
Towbin-Transferpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20 % (v/v) Methanol; 0,05 % (w/v) SDS; pH = 8,3
50x TAE-Puffer:	2 M Tris; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA pH 8,4

2.1.5.2 Stammlösungen

Antibiotika-Stammlösungen:	100 mg/ml Ampicillin in H ₂ O 20 mg/ml Chloramphenicol in 100% Ethanol Lagerung bei -20°C
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid, lichtgeschützt bei 4°C lagern
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,05% (w/v) Trypsin; 0,54 mM EDTA in PBS

**Phosphatase-
Inhibitoren-**

Stocks: 250 mM EGTA
900 mM NaF
150 mM Natrium pyrophosphate
200 mM Natrium orthovanadate

Steroid-

Stammlösungen: Alle verwendeten Steroide wurden in 100% Ethanol gelöst (1000x)

2.1.5.3 Zellkulturmedien

DMEM-High Glucose ohne Phenolrot (für SK-ER α): DMEM-Flüssigmedium wurde durch Zusatz von 1% L-Glutamin, 1% P/S, 10% FCS und 1% Natriumpyruvat supplementiert.

DMEM Nutrient Mixture F-12 Hams-Komplettmedium (für SH-SY5Y): DMEM

Nutrient Mixture F-12 Hams-Flüssigmedium wurde durch Zusatz von 1% L-Glutamin, 1% P/S und 10% FCS supplementiert.

RPMI 1640 Medium (für PC12): RPMI 1640-Flüssigmedium wurde durch Zusatz von 1% Glutamin, 1% P/S, 10% Horseserum und 5% FCS supplementiert

Alle Medien wurden nach der Supplementierung bei 4 °C gelagert.

2.1.5.4 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl in H₂O mit 2 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt; autoklavieren (121°C, 20 min)

LB-Agar-Platten: LB-Medium mit 1,5% Bactoagar

LB-Selektionsmedien: Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 20 µg/ml Chloramphenicol

LB-Medium mit 20mM Glucose: 1 g Bacto-Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 1 g NaCl, 98 ml H₂O; autoklavieren, anschließend 2 ml 1 M Glucose-Lösung zugeben

2.1.6 Inhibitoren und Aktivatoren

Inhibitor/Aktivator	Funktion	Konzentration und Inkubations-Zeit	Hersteller
Bradykinin	Neuropeptid; Rac-Aktivator	1 μ M/5 bzw. 30min	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Finasterid	Inhibitor der 5 α -Reduktase I/II	10 μ M/24,5h	Steraloids Inc., Newport, USA
Formestan	Inhibitor der P450 Aromatase	10 μ M/24,5h	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H-89	PKA Inhibitor; selektiv, Zell-permeabel;	10 μ M/30min	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LPA (Lysophosphatidsäure)	Rho-Kinase Aktivator	10 μ M/30min	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Naphthylethanol (S-(-)-1-Naphthyl-1-Ethanol)	Inhibitor der Sulfotransferase ST2A3	200 μ M/24,5h	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Inhibitor für Serin/Threonin Protein Phosphatasen	siehe Hersteller	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Inhibitor für Tyrosin Protein Phosphatasen	siehe Hersteller	Sigma, Taufkirchen
Protease-Inhibitoren-Cocktail Complete Mini	Protease Inhibitor	siehe Hersteller	Roche, Mannheim
Wortmannin	PI 3-Kinase Inhibitor; irreversibel, selektiv, Zell-permeabel; blockiert katalytische Aktivität der PI3-Kinase	1 μ M/30min	Sigma, Aldrich, Taufkirchen
Y-27632	Rho-Kinase I/II Inhibitor; ATP-kompetetiver Inhibitor, selektiv, Zell-permeabel	10 μ M/30min	Calbiochem/Merck, Darmstadt

2.1.7 Enzyme und Kit-Systeme

Enzyme für molekulargenetische Arbeiten, MBI Fermentas, St. Leon-Rot

NucleoBond® PC 500 EF, Macherey-Nagel

APOPercentage™ Apoptosis Assay, Biocolor Ltd., Irland

ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit, Calbiochem/Merck, Darmstadt

2.1.8 Steroide

Allopregnanolon (5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on)	Steraloids Inc., Newport, USA
Androstandiol (3 α ,17 β -Dihydroxy-5 α -Androstan)	Sigma, Taufkirchen
Androstendion (4-Androsten-3,17-dion)	Sigma, Taufkirchen
Dehydroepiandrosteron (DHEA / 5-Androsten-3 β -ol-17-on)	Sigma, Taufkirchen
DHEA-CMO (Dehydroepiandrosteron-Carboxymethyloxime)	Steraloids Inc., Newport, USA
Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S / 5-Androsten-3 β -ol-17-on Sulfat)	Sigma, Taufkirchen
5α-Dihydrotestosteron (17 β -Hydroxy-5 α -Androstan-3-on)	Sigma, Taufkirchen
17β-Estradiol (1,3,5[10]-Estratrien-3,17 β -diol)	Sigma, Taufkirchen
Estron (1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-on)	Sigma, Taufkirchen
Testosteron (4-Androsten-17 β -ol-3-on)	Sigma, Taufkirchen
Testosteron-CMO (Testosteron-Carboxymethyloxime)	Steraloids Inc., Newport, USA

2.1.9 Zelllinien

SH-SY5Y: Neuroblastomazellen, Spezies: human, kaukasisch, weiblich; Klon der Neuroblastomazelllinie SK-N-SH; Banca Cellule ICLC-IST Genova

Die Zellen wurden in phenolrot-freiem Ham's F12-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 10% fötalem Kälberserum kultiviert und 1:2 subkultiviert.

SK-ER α : Humane SK-N-MC-Zellen, die stabil mit dem Plasmid pIRES-ER α transfiziert sind. Überlassen von Herrn Prof. Behl, Universität Mainz.

Die Zellen wurden in DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin, 10% fötalem Kälberserum und 1% Natriumpyruvat kultiviert und 1:5 subkultiviert.

PC12: Pheochromocytoma-Zellen, Spezies: Ratte; Überlassen von Frau Dipl.-Biologin Dorothea Rat

Die Zellen wurden in RPMI 1640-Flüssigmedium mit 1% Glutamin, 1% P/S, 10% Horseserum und 5% FCS kultiviert und 1:3-1:6 subkultiviert.

2.1.10 Bakterienstämme

***E. coli* DH5 α :** ϕ 80 δ (*lacZ* Δ M15), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (rk- mk+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argFV169*), F-, λ -; von Clontech, Heidelberg.

Bei diesem Stamm handelt es sich um einen Abkömmling des *E. coli* K12, einem Sicherheitsstamm, dem die für die Pathogenität verantwortlichen Gene (Adhäsionsfaktoren, Invasionsfaktoren, Toxine etc.) fehlen.

Der Stamm diente zur Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA.

2.2 Allgemeine Methoden

2.2.1 Protein-Fällung (Chloroform/Methanol-Fällung)

Mit dieser Methode können Proteine aus einem Zellextrakt gefällt und von den Lipid-Komponenten isoliert werden. Dies geschieht durch Zusatz von zwei Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität. Es kommt zur Ausbildung von zwei Phasen, wodurch die Proteine von den Lipiden getrennt werden können. Zudem bietet diese Methode die Möglichkeit, SDS aus den Proteinproben zu entfernen. Mit dieser Methode wurden die Lysat-Proben für den Bradford-Assay oder die SDS-PAGE vorbereitet.

Zu 100 μ l Zell-Lysat wurden 800 μ l Methanol gegeben und die Proben gründlich gevortext und kurz abzentrifugiert. Dann wurden 200 μ l Chloroform zur Probe gegeben, wieder gründlich gevortext und abzentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 600 μ l Wasser zu den Proben gegeben, gevortext und 10 Minuten bei 14000 rpm (RT) zentrifugiert. Das Protein befand sich nach diesem Zentrifugationsschritt an der Phasengrenze. Die obere Phase (Methanol) wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Zur unteren Phase (Chloroform) und dem Protein wurden dann 800 μ l Methanol gegeben, gevortext und 25 Minuten bei 14000 rpm (RT) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren pelletierte das Protein am Boden des Reaktionsgefäßes und der Überstand wurde verworfen. Die Proteinpellets wurden bei RT getrocknet.

2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford. Beim Bradford-Reagenz handelt es sich um eine Lösung bestehend aus dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250, Ethanol und Phosphorsäure. In Gegenwart von Proteinen

verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brillantblau G-250 von 465 zu 595 nm. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums kommt vermutlich durch eine Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfat-Form durch die Komplexbildung mit dem Protein zustande. Der Farbstoff bindet sehr unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten der Proteine. Am wichtigsten sind hier die Wechselwirkungen mit Arginin. Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurden in allen Versuchen pro Probe 100 µl Lysat abgenommen und mittels Chloroform/Methanol gefällt. Die getrockneten Proteinpellets wurden dann in 100 µl 100%iger Ameisensäure aufgenommen. Jede Probe wurde dann dreifach verdünnt (mit 100%iger Ameisensäure) und mit Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Zu diesen 100 µl Proteinproben wurden dann 900 µl Bradford-Reagenz (1:5) gegeben. Die Proteinproben wurden dann 30 Minuten nach Zugabe des Bradford-Reagenz (1:5) bei einer Absorption von 595 nm vermessen. Zur Bestimmung der Eichgeraden wurde eine definierte BSA-Standardreihe mit finalen Proteinkonzentrationen von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg/100 µl verwendet. Die zu vermessenden Proteinproben wurden immer in Doppelbestimmung vermessen. Aus dem erhaltenen Mittelwert der einzelnen Bestimmungen wurde dann die Proteinmenge (µg/µl) der jeweiligen Probe errechnet, um gleiche Mengen an Protein für die Gelelektrophorese zu erhalten.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS ist ein anionisches Detergenz, welches die Eigenladungen der Proteine effektiv maskiert, so dass die Proteine nach ihrer Größe in einem entsprechenden Gelsystem aufgetrennt werden können. Es werden Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit (ein SDS-Molekül heftet sich an zwei Aminosäurereste) gebildet. Bei der Probenvorbereitung werden die Proteinproben mit einem Überschuß an SDS auf ca. 100°C erhitzt, um so die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zu lösen. Durch Zusatz von Dithiothreitol (DTT) werden zusätzlich die Schwefelbrücken zwischen den Cysteinresten gespalten. Bei der verwendeten Elektrophorese handelt es sich um eine diskontinuierliche Gelelektrophorese nach U. K. Laemmli, in der ein SDS-haltiges, diskontinuierliches HCl/Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt wird. Bei der Elektrophorese mit 0,1% SDS im Polyacrylamidgel erhält man über bestimmte Bereiche eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Micellen. Mit Hilfe eines Protein-Größen-Standards lassen sich dann die Molekulargewichte der Proteine ermitteln. Die für diese Arbeit verwendeten Polyacrylamidgele (Mini-Gele; Größe des Trenngels: 6 x 8 cm) setzten sich aus einem 5%igen Sammelgel und einem Trenngel (14%; 7,5%) zusammen. Das Sammelgel enthält sehr große Poren, so dass die Proteine sich bis zum Erreichen des Trenngels in einer scharfen Bande konzentrieren oder sammeln können. Die verwendeten Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Gel	Acrylamid/ Bisacrylamid	Puffer	H ₂ O	SDS (10%)	APS (10%)	Temed
Trenngel 14%	4,67 ml	1,25 ml 3M Tris-HCl pH 8,8	3,93 ml	0,1 ml	50 µl	5 µl
Trenngel 7,5%	2,50 ml	1,25 ml 3M Tris-HCl pH 8,8	6,10 ml	0,1 ml	50 µl	5 µl
Sammelgel 5%	1,70 ml	1,25 ml 0,5M Tris- HCl pH 6,7	6,80 ml	0,1 ml	100 µl	5 µl

Verwendeter Proteingrößenstandard:

"SeeBluePlus2 Pre-Stained Standard", (Invitrogen, Paisley (UK))

Tris-Glycin-Gel

Myosin	250 kDa
PhosphorylaseB	148 kDa
BSA	98 kDa
Glutamat-Dehydrogenase	64 kDa
Alkohol-Dehydrogenase	50 kDa
Carbonyl-Anhydrase	36 kDa
Myoglobin	22 kDa
Lysozym	16 kDa
Aprotinin	6 kDa
Insulin, β-Kette	4 kDa

Die gefällten Proteinproben wurden in jeweils 25 µl Probenpuffer aufgenommen, 20 Minuten bei 100°C gekocht, abzentrifugiert und dann auf das Gel aufgetragen. Während sich die zu trennenden Proteine im Sammelgel befanden wurde eine Stromstärke von 10 mA angelegt. Beim Übergang der Lauffront in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Die Gele wurden so lange laufen gelassen, bis die Lauffront in den Laufpuffer ausgetreten ist. Zum immunologischen Nachweis eines Proteins wurde das Gel für einen Western-Blot verwendet.

2.2.4 Western-Blotting

Bei dieser Methode werden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine über einen Elektrotransfer auf einen Träger (Nitrocellulose- oder PVDF-Membran) übertragen und immobilisiert. Die für diese Arbeit angefertigten Western-Blots wurden hauptsächlich im semy-dry-Verfahren hergestellt (Ausnahme: Nachweis von an Ser19 phosphorylierter MLC, Tank-Blot-Verfahren) und als Träger dienten ausschließlich Nitrocellulose-Membranen.

Zunächst wurden alle für den Blotsandwich benötigten Komponenten wie Nitrocellulosemembran, Whatman-Papier und Gel kurz in Towbin-Transferpuffer eingelegt.

Der Blotsandwich wurde luftblasenfrei wie folgt von der Anodenseite zur Kathodenseite hin zusammengebaut:

3 Lagen Whatman-Papier
Nitrocellulosemembran
Polyacrylamidgel
3 Lagen Whatman-Papier

Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte für 45 min bei 15 V und ca. 200 mA im semy-dry-Verfahren und bei max. 100 V für 120 min im Tank-Blot-Verfahren. Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose-Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 60 min bei RT oder bei 4°C über Nacht mit dem jeweiligen Blocking-Puffer inkubiert und dann 2 x 5 Minuten im jeweiligen Waschpuffer gewaschen.

Danach erfolgten die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern und die Entwicklung der Blots.

2.2.5 Lipidextraktion

Die Extraktion der Gesamtlipide aus den Zellextrakten wurde nach der Methode von Bligh und Dyer (modifiziert) durchgeführt. Die Methode von Bligh und Dyer eignet sich besonders gut, wenn größere Mengen an Lipiden extrahiert werden sollen.

Für die Extraktion von Lipiden aus Zellhomogenaten wurden die Zellen zunächst nach der jeweiligen Behandlung zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit Hilfe eines „Cellscrapers“ von der Zellkulturschale gelöst und in 1ml PBS aufgenommen. Zu dem Zellhomogenat wurden dann 2,5 ml Methanol und 1,25 ml Chloroform hinzugegeben und für 1 Minute gründlich gevortext. Der einphasige Extrakt wurde dann für 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Danach wurden 1,25 ml Chloroform und 1,25 ml H₂O zugegeben und erneut für 1 Minute gevortext. Durch die Zugabe von H₂O kommt es dann zur Phasentrennung, die durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 Minuten komplettiert wird. Nach diesem Zentrifugationsschritt befinden sich die Lipide in der Chloroform-Phase und die Proteine bzw. Nukleinsäuren an der Phasengrenze zur wässrigen Phase. Die wässrige Phase wurde dann verworfen und die Chloroform-Phase in einen Glaskolben überführt. Das Chloroform wurde dann mittels eines Rotationsverdampfers entfernt und die Lipide bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

2.2.6 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (TLC, Thin Layer Chromatography) wird zur Trennung von Lipiden verwendet. Klassischerweise werden hierzu Kieselgelplatten eingesetzt, die als

stationäre Phase dienen. Als lösliche Phase dient das Laufmittelgemisch, das den Laufeigenschaften der zu trennenden Lipide angepasst wird. Die Lipidgemische werden mittels Kapillare auf eine Startzone aufgetragen. Nachdem das Lösungsmittel vollständig verdunstet ist, wird die Platte in eine Laufkammer mit dem jeweiligen Laufmittel gestellt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Laufkammer mit dem Dampf des jeweiligen Laufmittels gesättigt ist und die Startfront mit den aufgetragenen Lipiden nicht unmittelbar mit dem Laufmittel in Berührung kommt. Die einzelnen Komponenten des zu trennenden Lipidgemisches werden dann entsprechend ihrer Affinität zur stationären Phase unterschiedlich stark vom Laufmittel mitgenommen und somit aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt so lange, bis die Laufmittelfront ca. 1 cm unter den oberen Rand der Kieselgelplatte gelaufen ist. Die analytische DC wurde zur Auftrennung von Steroiden und Syntheseprodukt-Gemischen verwendet. Zur Aufreinigung von Syntheseprodukten wurde die präparative DC verwendet. Bei der präparativen DC kann erheblich mehr Substanz aufgetragen werden und nach der Auftrennung aus der Kieselgelplatte ausgekratzt und eluiert werden.

Die verwendeten Laufmittel sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

Die Platten wurden nach dem Lauf getrocknet und mit einer der folgenden Methoden entwickelt:

- Anfärben der Lipidspots mittels Joddämpfen
- Anfärben der Steroidspots mittels Ammoniummolybdat/ H_2SO_4 oder $H_2SO_4/MeOH$
- Detektion mittels UV-Lampe

2.2.6.1 Beschichten von Kieselgelplatten mit Silbernitrat

Diese Methode wurde zur Darstellung verschiedener Steroide aus Zellextrakten angewendet. Hierbei handelt es sich um ein sehr empfindliches Nachweissystem, da sich Steroide auch noch im Nanogramm-Bereich sehr gut detektieren lassen.

Die Kieselgelplatten wurden mit einer 4,06%igen $AgNO_3$ -Lösung beschichtet. Dazu wurden 4,06% $AgNO_3$ (w/v) in einem Gemisch von 8,5 ml Wasser und 90 ml Aceton gelöst. Die Kieselgelplatten wurden kurz bis zur vollständigen Benetzung in die Silbernitrat-Lösung gelegt und dann für ca. 15 Minuten an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen der Platten wurden diese dann für eine Stunde bei $80^\circ C$ auf einer Heizplatte erhitzt. Alle Schritte wurden unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt.

2.2.6.2 Auftrennung von Steroiden mittels $AgNO_3$ beschichteter Kieselgelplatten

Die mittels Lipidextraktion isolierten Steroide aus Zellextrakten wurden in 10 μl der mobilen Phase Toluol/Aceton/Chloroform (8:2:5 v/v) aufgenommen und mit Hilfe einer Kapillare auf die Kieselgelplatte aufgetragen. Nachdem das Lösungsmittel vollständig verdunstet war,

wurden die Platten in eine mit dem Laufmittel Toluol/Aceton/Chloroform (8:2:5 v/v) dampfgesättigte Laufkammer gestellt. Die Platten wurden so lange laufen gelassen, bis sich die Laufmittelfront ca. 1 cm unter dem oberen Rand der Kieselgelplatte befand. Die Platten wurden dann ca. 30 Minuten an der Luft (lichtgeschützt) getrocknet. Zum Detektieren der Steroidspots wurden die Platten mit einer 0,5 x Molybdat-Lösung besprüht. Dazu wurden 10% (w/v) Ammoniummolybdat in 10% (v/v) Schwefelsäure gelöst und dann 1:1 mit Wasser verdünnt. Nach dem Besprühen wurden die Platten dann so lange bei 100°C erhitzt, bis blaue Spots sichtbar wurden.

2.2.7 Luciferase-Assay

2.2.7.1 Dual-Luciferase-Test

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein duales Luciferase-System verwendet. Um die Aktivität bestimmter Promotoren nach Transfektion von Zellen zu untersuchen, setzt man in einem geeigneten Vektor ein Reporterogen unter die Kontrolle des betreffenden Promotors. Als Reporter gene verwendet man meistens Gene, die für leicht nachweisbare Enzyme, wie die Luciferase, kodieren. Die Enzymaktivität gilt als Maß für die Fähigkeit des Promotors die Transkription zu aktivieren bzw. zu regulieren.

Das verwendete Luciferase-System enthielt bereits die Promotorsequenz für den Estrogen Rezeptor α (ESR1; homo sapiens). Normalerweise kommt die Luciferase in Säugerzellen nicht vor, so dass es bei der Messung keine Hintergrundaktivität gibt. Die Bestimmungsmethode ist sehr sensitiv, es können bereits Femtogramm-Mengen an Luciferase nachgewiesen werden.

Das Luciferase-System stellt somit einen guten Reporter-Assay dar. Die Expression des Firefly-Luciferase-Reporters kann im Luminometer anhand der Substratumsetzung gemessen werden und ist ein Maß für die Aktivität des Promotors. Die Transfektionseffizienz wird über die Aktivität der Renilla-Luciferase (kotransfizierter „Kontroll-Reporter“) bestimmt. Außerdem verwendet man deren Aktivität zur Normierung der Aktivität der Firefly-Luciferase („Reporter-Vektor“):

Normierte Lumineszenz = Firefly-Luciferase (RLU) / Renilla-Luciferase (RLU)

Die Luciferaseaktivität ist linear bis zu 200 μ g Protein im Zellextrakt.

Die Firefly-Luciferase katalysiert in biolumineszenten Organismen die Produktion von Licht und benötigt dafür Luciferin, ATP und molekularen Sauerstoff als Substrate:



Abbildung 22: Biolumineszenzreaktion der Firefly-Luciferase (Promega)

In der ersten Reaktion wird unter ATP-Verbrauch und der Produktion von Pyrophosphat (PPi) das Luciferyl-AMP als Zwischenprodukt gebildet, das im zweiten Schritt oxidativ zu Oxyluciferin decarboxyliert wird. Dabei werden Kohlendioxid, AMP und Licht (hu) freigesetzt. Das Enzym benötigt Mg^{2+} als Cofaktor. Die Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Freisetzung eines Photons.

Das Enzym Renilla-Luciferase katalysiert in biolumineszenten Organismen die Produktion von Licht und benötigt dafür Coelenterazin und molekularen Sauerstoff als Substrate:

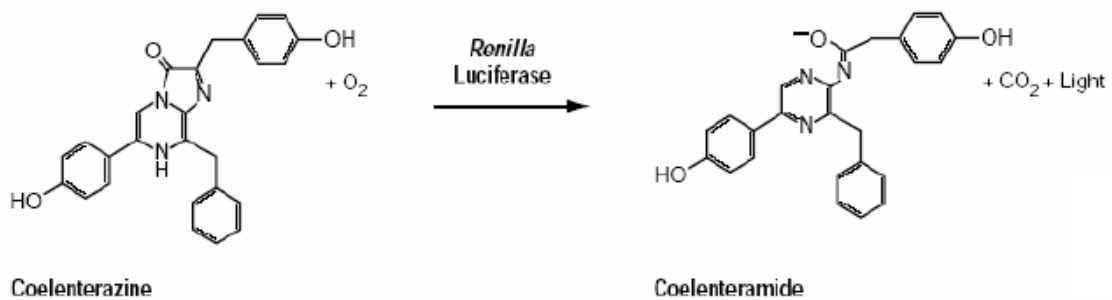


Abbildung 23: Biolumineszenzreaktion der Renilla-Luciferase (Promega)

Die Luciferase katalysiert die Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid unter Freisetzung eines Photons.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Luciferase-Vektor pERa-Pluc und der Kontrollvektor phRL-SV40 verwendet. Die Zellen wurden stets mit beiden Plasmiden kotransfiziert. Die konstitutive Aktivität des Renilla-Kontrollenzym wurde im selben Ansatz wie die Luciferaseaktivität des ER α Promotorkonstrukts bestimmt. Somit wurde die Transfektionseffizienz bei der Auswertung der Messergebnisse immer berücksichtigt.

2.2.7.2 Messung der Dual-Luciferase-Aktivität an transient transfizierten Zellen

Zur Messung der Luciferaseaktivitäten wurden 5 μl des Zellextraktes in eine 96 Well Platte pipettiert. Die Messung erfolgte in einem Chemiluminometer bei Raumtemperatur. Dieses Gerät verfügt über zwei Injektoren. Nacheinander wurden einmal 40 μl Luciferase-LARII-Puffer zum Lysat gepumpt, gerüttelt und nach der Luciferasemessung werden 40 μl „Stop and Glo“-Puffer zu der Mischung gepumpt, wieder gerüttelt und der Renilla-Wert gemessen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem ER Luciferase Empty Control Vektor

transfiziert waren. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität der Promotorkonstrukte anhand der Renilla-Aktivität normalisiert, indem der Luciferasewert durch den Renilla-Wert geteilt wurde. Alle ermittelten Firefly-Luciferase- und Renilla-Luciferasewerte eines Wells (Mehrfachmessung im Gerät) wurden gemittelt. Anschließend wurde der gemittelte Luciferasewert durch den gemittelten Renilla-Wert geteilt ($RLU = \text{Luc}/\text{Ren}$). Die relativen Luciferaseaktivitäten (RLUs) einer Transfektion bzw. die RLUs von gleichen Transfektionen wurden wiederum gemittelt und die Standardabweichungen berechnet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* DH5 α erfolgte in autoklaviertem LB-Medium, die von transformiertem *E. coli* in dem entsprechenden Medium mit Zusatz von Antibiotika. Die Kultivierung zur Vereinzelung der Bakterienklone und für die Plasmidpräparation erfolgte für ca. 15 h bei 37°C im Brutschrank auf LB-Agar-Platten.

2.3.2 Lagerung von *E. coli*

Für die langfristige Aufbewahrung von *E. coli* DH5 α oder von Transformanden wurde der entsprechende Klon in LB-Medium mit Zusatz von Antibiotika herangezogen (5 h; 37°C; 120 rpm Inkubationsschüttler). 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden zu 500 μ l sterilem Glycerin gegeben, gut durchmischt und zunächst bei -20°C eingefroren. Die endgültige Lagerung erfolgte dann bei -80°C.

2.3.3 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Bakterienzellen. Durch Replikation und Expression der eingebrachten DNA weisen die Bakterien neue, selektionierbare Eigenschaften auf.

2.3.3.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Transformation wurden 100 μ l chemisch kompetente *E. coli* langsam auf Eis aufgetaut. Dazu wurden 8 μ l Ligationsansatz bzw. ~ 80 ng Plasmid-DNA gegeben. Die Probe wurde vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert.

Nach erneutem Mischen wurde für 90 s ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Die Bakterien wurden 3 min auf Eis abgekühlt, bevor sie in 800 μ l LB-Medium/20 mM Glucose aufgenommen wurden. Die Regeneration der rekombinanten Bakterien erfolgte für 1 h bei 37°C im Bakterien-schüttler. Danach wurden 100-800 μ l der Flüssigkultur auf entsprechende LB-Agar-Selektionsplatten ausplattiert und 15 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Da die Plasmide Resistenzgene für bestimmte Antibiotika tragen, sind die Bakterien nach einer erfolgreichen Aufnahme des Plasmids in der Lage, auf entsprechenden Selektionsplatten zu wachsen. Diese Resistenz erlaubt somit die Selektion rekombinanter Bakterienklone.

2.3.4 Endotoxinfreie Plasmidpräparation

Um endotoxinfreie DNA für die Transfektion von eukaryotischen Zellen zu erhalten, wurde die Präparation mit Hilfe einer DNA-bindenden Säule (NucleoBond® PC 500 EF, Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt. Die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm gemessen. Als Referenz diente TE-Puffer. Für die Messung wurden UVetten verwendet. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Bei 280 nm absorbieren die in Proteinen vorkommenden aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan.

Die Nukleinsäurelösung wurde in einer geeigneten Verdünnung (1:50 und 1:100) in eine Küvette gegeben. Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung gilt das Lambert-Beersche Gesetz. Der Wert 1 der Extinktion bei 260 nm entspricht für doppelsträngige DNA einer Konzentration von 50 µg/ml und für einzelsträngige RNA einer Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (E_{260}/E_{280}) liegt für proteinfreie DNA-Lösungen bei 1,8 und für reine RNA-Lösungen bei 2.

Die DNA-Konzentration wurde nach der folgenden Formel bestimmt:

$$A_{260} \times V \times OD = \mu\text{g}/\mu\text{l Nukleinsäure}$$

A_{260} : Absorption bei 260 nm

V: Verdünnungsfaktor der eingesetzten Nukleinsäuren

OD: optische Dichte

Die optische Dichte wird folgendermaßen definiert:

1 OD = 50 µg/ml doppelsträngige DNA

1 OD = 40 µg/ml einzelsträngige DNA bzw. RNA

2.3.6 Elektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nukleinsäuren

Plasmid-DNA kann in Agarosegelen mittels Elektrophorese aufgetrennt und so auf ihre Größe hin überprüft werden.

Agarose (1%) wurde in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle durch Kochen gelöst und nach dem Abkühlen auf unter 50°C mit 1 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung versetzt.

Ungefähr 50 ml dieser Lösung wurden in eine abgedichtete Gelkammer aus Plexiglas gegossen. Nach dem Abkühlen und Erstarren wurde das Gel in eine Flachbettgelapparatur gelegt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben (20 µl) wurden mit 4 µl DNA-Auftragspuffer versetzt. Der im Puffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau markierte die Lauffront. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei ca. 100 mA. Zur Bestimmung von Fragmentlängen wurde ein DNA-Größenstandard (Angaben der DNA-Fragmentgrößen in Basenpaaren) mit auf das Gel aufgetragen:

1 kb-Leiter (Fermentas GeneRuler 1kb DNA ladder): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 250

Die Visualisierung der DNA erfolgte mittels Ethidiumbromid, das in die DNA Doppelhelix interkaliert und nach UV-Anregung bei 312 nm fluoresziert. Das Ergebnis wurde mit einer Digitalkamera dokumentiert.

2.3.7 Restriktionshydrolyse

Restriktionsendonukleasen sind eine Gruppe von Nukleinsäurehydrolasen, die doppelsträngige DNA schneiden können. Sie erkennen in der Regel innerhalb einer DNA-Doppelhelix spezifische 4 bis 8 Basenpaare lange palindromische Sequenzen und hydrolysieren die Phosphordiesterbindungen. Dabei können 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends) entstehen.

Die Restriktionsanalyse wurde zur Überprüfung der Plasmispräparation durchgeführt. Die Hydrolyse der DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas) durchgeführt. Dabei gilt: 1 Unit Enzym spaltet 1 µg DNA in einer Stunde.

Für die Hydrolyse wurden 0,5-1 µl Plasmid-DNA aus der Plasmid-Präparation, 4 µl 2x Restriktionspuffer und 0,5-1 µl des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt. Die Ansätze wurden anschließend mit Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Spaltungsreaktion erfolgte für 90 min bei 37°C

2.4 Zellkultur

2.4.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen in der Zellkultur

Die Arbeiten mit eukaryontischen Zellen fanden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank der Sicherheitsstufe 2 statt. Alle in der Zellkultur verwendeten Glasgeräte wurden bei 180°C über Nacht im Trockenschrank sterilisiert. Die benötigten Puffer und Lösungen wurden bei 120°C und 2 bar für 20 Minuten autoklaviert, sofern diese nicht steril von der jeweiligen Firma abgefüllt waren. Kunststoff-Röhrchen, Kulturschalen und Einweg-Pipetten wurden unter der Sterilbank aus der Verpackung genommen und geöffnet.

2.4.2 Kulturbedingungen

Die Säugetierzellen wurden in einem CO₂-Brutschrank mit 5% CO₂, 95% Luft, 100% Luftfeuchtigkeit und bei 37°C in Kultur gehalten.

2.4.2.1 Kulturbedingungen für SH-SY5Y Neuroblastomazellen

Die SH-SY5Y Neuroblastomazellen wurden in Gewebekulturschalen von 10 cm ausgesät und jeweils für ca. 4-5 Tage in DMEM F-12 HAM Medium kultiviert.

Für die Mikroskopie wurden die Zellen auf 10 mm Trägergläschen ausgesät und je nach gewünschtem Differenzierungsgrad 2-13 Tage kultiviert.

2.4.2.2 Differenzierung von SH-SY5Y Neuroblastomazellen mit Retinolsäure in der Zellkultur

Die Zellen wurden für die Mikroskopie in eine 24 Well-Schale auf 10 mm Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen 1:20000 (undifferenziert), 1:60000 (mitteldifferenziert) und 1:80000 (hochdifferenziert) ausgesät.

Für Proteinbiochemische Untersuchungen wurden die Zellen in 10 cm Schalen 1:2 (undifferenziert), 1:6 (mitteldifferenziert) und 1:8 (hochdifferenziert) ausgesät.

2.4.2.2.1 Differenzierungs-Protokolle:

a) für „undifferenziert“

Die Zellen wurden für die Mikroskopie auf Poly-L-Lysin beschichtete 10 mm Trägergläschen ausgesät und 2-3 Tage entsprechend einer Konfluenz von 75-80% kultiviert und dann nach 2x Waschen mit FCS-freiem Medium den Zellen für 24h das Serum entzogen. Für Proteinbiochemische Untersuchungen wurden die Zellen in 10 cm Schalen ausgesät und 3-

4 Tage entsprechend einer Konfluenz von 90-95% kultiviert und dann nach 2x Waschen mit FCS-freiem Medium den Zellen für 24h das Serum entzogen.

b) für „andifferenziert“

Sowohl für die Mikroskopie als auch für Proteinbiochemische Untersuchungen wurden die Zellen 4 Tage nach Zellaussaat einmal mit Retinolsäure behandelt.

Endkonzentration: 10 μ M (5 μ l 2 mM-Stock / ml Medium)

7 Tage nach Zellaussaat wurden die Zellen 2x mit FCS-freiem Medium gewaschen und dann für weitere 24h in FCS-freiem Medium weiter kultiviert.

Am 8. Tag wurden die entsprechenden Versuche durchgeführt.

c) für „mittlere Differenzierung“

Sowohl für die Mikroskopie als auch für Proteinbiochemische Untersuchungen wurden die Zellen 4 Tage nach Zellaussaat einmal mit Retinolsäure behandelt, nach 7 Tagen das zweite Mal.

Endkonzentration: 10 μ M (5 μ l 2 mM-Stock / ml Medium)

11 Tage nach Zellaussaat wurden die Zellen 2x mit FCS-freiem Medium gewaschen und dann für weitere 24h in FCS-freiem Medium weiter kultiviert.

Am 12. Tag wurden die entsprechenden Versuche durchgeführt.

d) für „hohe Differenzierung“

Sowohl für die Mikroskopie als auch für die Proteinbiochemischen Untersuchungen wurden die Zellen 4 Tage nach der Zellaussaat an vier aufeinander folgenden Tagen mit Retinolsäure behandelt. Endkonzentration: 10 μ M (5 μ l 2 mM-Stock / ml Medium)

Am 11.Tag wurden die Zellen 2x mit FCS-freiem Medium gewaschen und für 24h in FCS-freiem Medium weiter kultiviert. Am 12. Tag wurden die entsprechenden Versuche durchgeführt.

2.4.2.3 Kulturbedingungen für SK-ER α

Die SK-ER α Zellen wurden in Gewebekulturschalen von 10 cm ausgesät und jeweils ca. für 3-4 Tage in DMEM High Glucose Medium kultiviert. Bei jeder 3. Passage wurde dem Kulturmedium G 418 in einer Konzentration von 1mg/ml zugesetzt.

2.4.2.4 Kulturbedingungen für PC12 /Vorbereitung auf Apoptose-Assay

Die PC 12 Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichtete 10 cm Gewebekulturschalen ausgesät und 4-5 Tage in RPMI 1640 Medium kultiviert.

Zur Vorbereitung auf den Apoptose-Assay wurden die PC 12 Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete 24 Well Platten ausgesät (60000 Zellen/Well) und 24h in FCS-haltigem RPMI 1640 Medium kultiviert (Konfluenz 95%).

2.4.3 Transiente Transfektion von SK-ER α

In Vorbereitung auf den Dualen-Luciferase-Assay wurde eine transiente Transfektion der SK-ER α mit Lipofectamine 2000 durchgeführt. Bei Lipofectamine 2000 handelt es sich um ein auf kationischen Lipiden basierendes Transfektionsreagenz. Bei der sogenannten Lipofektion binden die negativ geladenen DNA-Moleküle an die kationischen Lipide. Die DNA-Lipid-Komplexe werden dann Endocytose-vermittelt in die Zelle aufgenommen und die DNA gelangt dann in den Kern. Dort kommt es dann nach 24 bis 72 h zur Expression des gewünschten Proteins.

Ein Tag vor der Transfektion wurden die SK-ER α auf 30000 Zellen/Well in eine 24 Well-Schale ausgesät und in DMEM ohne Phenolrot mit 10 % FCS, 1% Glutamin, 1% Natriumpyruvat und ohne P/S kultiviert. Die Konfluenz am Tag der Transfektion betrug 80%. Als Transfektionsmedium wurde das oben beschriebene Medium verwendet, jedoch ohne Zusatz von FCS. Der Transfektionsmix wurde wie folgt zusammengestellt: Pro Well wurden 100 μ l Transfektionsmedium und 100-400 ng DNA bzw. 100 μ l Transfektionsmedium und 2 μ l Lipofectamine 2000 gemischt und die Premixe 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden der DNA-Premix und der Lipofectamine-Premix gemischt und nach 20 Minuten Inkubation auf die Zellen gegeben. Dabei wurden die alten Kulturüberstände entfernt und die Zellen zweimal mit 500 μ l/Well Transfektionsmedium gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 200 μ l DNA/Lipofectamine-Mix pro Well. Nach 5 bzw. 20 Stunden Transfektion erfolgte die Abnahme des Transfektionsmediums.

2.4.3.1 Stimulation und Lyse der transfizierten Zellen

5 bzw. 20 Stunden nach der Transfektion wurden die zu testenden Substanzen in DMEM mit 1% P/S und 10% charcoal stripped FCS zu den Zellen gegeben und 48 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 100 μ l Lysis-Puffer lysiert. Als Lysis-Puffer wurde passiver Lysis-Puffer von Promega verwendet. Zur Unterstützung der Lyse wurden die Zellen für mindestens 1 Stunde bei -20°C gelagert, in Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert.

2.4.4 Zellpassage

Bei der Zellpassage wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und auf die Zellen wurde 1ml (für 10 cm Schale) einer Trypsin/EDTA Lösung (0,05 % (w/v) Trypsin, 0,6 mM EDTA in PBS) gegeben.

Nach 5 minütiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit insgesamt 9 ml PBS pro Schale abgelöst und in einem Greiner-Röhrchen mit 8 ml vorgelegtem Medium vereinigt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde dann nach der Zentrifugation abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 (für SH-SY5Y) und 1:5 (SK-ER α und PC12) auf neue Gewebekulturschalen verteilt.

2.4.5. Kryokonservierung

Zum Anlegen einer Dauerkultur wurden die SH-SY5Y Neuroblastomazellen bei 70% und 90% Konfluenz eingefroren. Dabei wurden die Zellen wie bei der Zellpassage behandelt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet dann aber in nur 1 ml Medium (phenolrot-freiem Ham's F12-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 10% fötalem Kälberserum) plus 10% DMSO bzw. 5% DMSO resuspendiert. Die Kryoröhrchen wurden in einem Einfrier-Behälter, mit Isopropanol gefüllt (Abkühlungsrate: 1°C / min), zunächst bei -80°C für 4-6 h eingefroren und dann in der N₂-Gasphase (-152°C) gelagert.

SK-ER α -Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll eingefroren, jedoch bei einer Konfluenz von nur 70% und in 95% FCS plus 5% DMSO.

2.5 Herstellung der Steroid-Stammlösungen

Steroid	Lösungsmittel	Stock-Lösung	Finale Konzentration
17 β -Estradiol	100% EtOH	30 μ M	30 nM
5 α -DHT	100% EtOH	30 mM	30 μ M
Allopregnanolon	100% EtOH	30 μ M	30 nM
Androstandiol	100% EtOH	30 mM	30 μ M
Androstenedion	100% EtOH	30 mM	30 μ M
DHEA	100% EtOH	30 mM	30 μ M
DHEA	100% EtOH	30 μ M	30 nM
DHEA-Bodipy	100% EtOH	30 mM	30 μ M
DHEA-Bodipy	100% EtOH	30 μ M	30 nM
DHEA-S	100% DMSO	30 mM	30 μ M
Estron	100% EtOH	30 mM	30 μ M
Testosteron	100% EtOH	30 mM	30 μ M
Testosteron	100% EtOH	3 μ M	3 nM
Testosteron-Bodipy	100% EtOH	30 mM	30 μ M

Von den einzelnen Steroiden wurden zunächst Stammlösungen mit einer Konzentration von 30 mM bzw. 30 μ M für DHEA (DHEA-Bodipy), 30 mM für DHEA-S, 17 β -Estradiol, Androstandiol, Androstendion, Estron, 5 α -DHT und Allopregnanolon und 30 mM bzw. 3 μ M

für Testosteron (Testosteron-Bodipy) angelegt. Entsprechend dieser Konzentration wurden alle Steroide in 1 ml 100 % Ethanol gelöst.

2.5.1 Steroidbehandlung der Zellen

Die Zellen wurden vor der Behandlung mit den Steroiden 24h in FCS-freiem Medium kultiviert.

Es wurden in einem Reaktionsgefäß 1,5 µl der jeweiligen Steroid-Stammlösung zu 1,5 ml vorgewärmten (37°C) FCS-freiem Medium gegeben. Dies entspricht den in der Tabelle angegebenen finalen Steroid-Konzentrationen und einer finalen Konzentration von 0,1% EtOH bzw. 0,1% DMSO.

In jedes Well wurden dann 500 µl Steroid-Lösung gegeben und die Zellen 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.6 Immunfluoreszenzfärbung neuronaler Zellen

Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen 1x kurz und 1x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 15 min mit Paraformaldehyd (3,7%) fixiert. Nach dem Fixieren wurde 1x kurz mit PBS gewaschen und dann zum Permeabilisieren der Zellen 10 min TritonX-100 (0,05%) zu den Zellen gegeben. Nach dem Permeabilisieren wurde wieder 1x kurz und 1x 5 min mit PBS gewaschen. In einer feuchten Kammer erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen 1. Antikörper (siehe 2.1.3.1 unter IF). Pro 10 mm Deckgläschen wurden 20 µl Antikörper auf Parafilm aufgetragen und die Deckgläschen mit den Zellen nach unten in den Antikörper gelegt. Danach wurden die Zellen wieder 1x kurz und 1x 5 min mit PBS gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem Fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörper (siehe 2.1.3.2 unter IF). In einem weiteren Schritt wurden die Zellen wieder 1x kurz und 1x5 min mit PBS gewaschen und anschließend in Mowiol eingebettet (Trocknen: mindestens 30 min, 37°C auf dem Wärmeblock oder über Nacht).

2.6.1 Färbung der Mitochondrien

Die Färbung der Mitochondrien erfolgte mittels Mitotracker[®]Orange an lebenden SH-SY5Y-Zellen. Die Zellen wurden mit 500 nM Mitotracker[®]Orange in FCS-freiem Medium für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit DHEA-Bodipy für 30 Minuten bei 37°C. Danach wurden die Zellen 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit 3,7% Paraformaldehyd für 15 Minuten fixiert. Die fixierten Zellen wurden erneut 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend in Mowiol eingebettet.

2.7 Mikroskopie

2.7.1 Mikroskopie an fixierten Zellen

Die fixierten, gefärbten Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 100) mikroskopiert. Die Anregungswellenlängen für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe können der folgenden Tabelle entnommen werden. Die Zellen wurden mit einem 40x oder 100x Fluor-Objektiv mikroskopiert. Von den mikroskopierten Zellen wurden Aufnahmen mit einer MicroMax CCD-Kamera (Princeton Instruments, Trenton, NJ (USA)) gemacht. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software MetaView Imaging System (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA (USA)).

Fluoreszenzfarbstoff	Absorption [nm]	Emission [nm]
Bodipy[®]	503	510
Cy3	550	570
FITC	490	520
Mitotracker[®]Orange	550	570

2.8 Spezielle Methoden

2.8.1 Apoptose-Assay (APOPercentage[™] Assay)

Die Plasmamembran von Säugetier-Zellen weist eine semi-fluide Mosaik-Struktur aus Phospholipiden, integralen Proteinen und Cholesterin auf. Den Hauptteil der Plasmamembran stellen die Phospholipide, die in Form eines „bi-layers“ asymmetrisch angeordnet sind. Die äußere Plasmamembran besteht hauptsächlich aus Cholin-haltigen Phospholipiden (Phosphatidylcholin und Sphingomyelin), die in Kontakt mit dem extrazellulären Medium (in vivo) oder dem Zellkultur-Medium (in vitro) stehen.

Die innere Plasmamembran besteht hauptsächlich aus Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin und steht mit dem Cytoplasma in Kontakt. Die asymmetrische Komposition der Phospholipide in der Plasmamembran ist ein Hauptmerkmal von lebenden Zellen. Diese asymmetrische Komposition ist essentiell für normale Membran-Funktionen und wird durch „flippasen“ reguliert, die den aktiven Transport von Aminophospholipiden von der äußeren zur inneren Membran katalysieren. In apoptotischen Zellen wird die Aktivität der „flippase“ durch die Aktivität eines anderen Enzyms, nämlich der sogenannten „floppase“ oder „scramblase“ inhibiert.

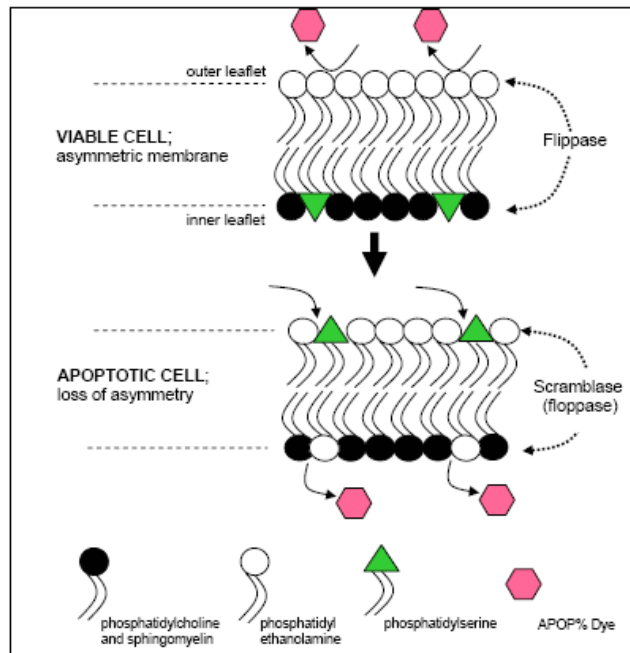


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Phospholipid-Zusammensetzung einer lebenden und einer apoptotischen Zelle. Phosphatidylcholine kommen am häufigsten in der Plasmamembran vor. Diese organisierte Zusammensetzung ist für die normale Funktion einer Zelle essentiell. Die Aufrechterhaltung der Asymmetrie ist ein energieabhängiger Prozess und bedingt die Aktivität von „Flippasen“. In apoptotischen Zellen wird die Aktivität der „Flippasen“ durch die Aktivität von „Floppasen“ gehemmt. Der Transfer von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran erlaubt den Transport des APOPercentage® dye in die Zelle. Die Aufnahme des Farbstoffs ist uni-direktional und führt zu einer Akkumulation des Farbstoffs.

Die „floppase“ wird durch einen schnellen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert und stört die Phospholipid-Verteilung zwischen der inneren und der äußeren Plasmamembran („flip-flop“-Mechanismus). Dies führt dazu, dass Phosphatidylserin an der äußeren Membranseite exponiert wird. Diese Exposition führt zu einer Aufnahme des APOPercentage® Farbstoffs (ähnlich der Annexin-V-Bindung an Phosphatidylserin) in die Zellen und somit zu einer selektiven Färbung.

Der Apoptose-Assay wurde an PC-12 Zellen in 24-Well Schalen durchgeführt. Es wurden 60000 Zellen pro Well ausgesät und 24h in Serum-haltigem RPMI-Medium kultiviert. Danach wurden folgende Behandlungen durchgeführt:

Ansatz	Serum	Substanz
1	+ 24h	-
2	- 24h	-
3	- 24h	+ 24h DHEA 30 nM
4	- 24h	+ 24h DHEA-BP 30 nM
5	- 24h	+ 24h DHEA 30 µM
6	- 24h	+ 24h DHEA-BP 30 µM
7	- 24h	+ 24h 17β-Estradiol 30 nM
8	- 24h	+ 24h DMF
9	- 24h	+ 24h Bodipy 3 µM
10	- 24h	+ EtOH 0,1%
11	+ 24h	+ 2h 1 mM H ₂ O ₂

Die Zellen, die 24h in Serum-haltigen Medium kultiviert wurden dienten als Negativkontrolle. Zur Apoptose-Induktion wurde den Zellen das Serum für 24h entzogen bzw. als Positivkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit 1 mM H₂O₂ für 2h in Serum-haltigen Medium bei 37°C. Die entsprechende Steroid-/Substanz-Behandlung wurde unter Serum-freien Bedingungen für 24h bei 37°C durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Apoptose-Farbstoff in frischem Medium (1:20) mit den entsprechenden Substanzen gemäß der obigen Tabelle zugesetzt. Die Inkubationszeit des Farbstoffes betrug 30 Minuten bei 37°C. Nach der Farbstoff-Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Farbkamera photographiert. Zur Ermittlung der Apoptoserate mittels Absorptionsmessung wurden die Zellen mit eingelagertem Farbstoff mit einem „dye release reagent“ behandelt. Bei dem „dye release reagent“ handelt es sich um eine alkalische Lösung, die die Zellmembranen der Zellen zerstört und somit den in den Zellen akkumulierten Farbstoff wieder freisetzt. Die Apoptoserate wurde dann mittels der Absorption des Farbstoffs bei 550 nm ermittelt.

2.8.2 Fraktionierung von Proteinen mittels ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit

Mit dieser Methode ist es möglich, das Proteom einzelner Zellkompartimente zu isolieren. Die Proteine der einzelnen Zellkompartimente unterscheiden sich in ihrer Solubilisierung. Mit verschiedenen Lysispuffern unterschiedlicher Salz- und Detergenzkonzentration ist es möglich, die Proteine nativ aus dem Cytoplasma, Membranen und Organellen, dem Zellkern und dem Cytoskelett zu isolieren.

Für die Fraktionierung der Proteine aus den einzelnen Zellkompartimenten wurden die adherenten SH-SY5Y-Zellen 2x mit eiskaltem Waschpuffer für 5 Minuten bei 4°C gewaschen. Für die Extraktion der cytosolischen Proteine wurde pro 10 cm Kulturschale 1 ml eiskalter Extraktionspuffer 1 + 5 µl Protease Inhibitor Cocktail auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Extraktionspuffer 1 in ein Reaktionsgefäß überführt und 25 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den cytosolischen Proteinen wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt (bei 4°C) und das evtl. gebildete Zellpellet verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 1ml eiskaltem Extraktionspuffer 2 + 5 µl Protease Inhibitor Cocktail für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Wieder wurde der Extraktionspuffer 2 in ein Reaktionsgefäß überführt und für 25 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den Membran- und Organellen-Proteinen wurde dann ebenfalls in ein neues Reaktionsgefäß (bei 4°C) überführt und das evtl. gebildete Zellpellet verworfen. Zur Extraktion der nukleären Proteine wurde anschließend 0,5 ml eiskalter Extraktionspuffer 3 + 5 µl Protease Inhibitor Cocktail + 1,5 µl Benzonase® (Nuclease) zu den Zellen gegeben und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde auch hier wieder der Extraktionspuffer 3 in ein Reaktionsgefäß überführt und für 25 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert,

anschließend der Überstand wieder in ein neues Reaktionsgefäß (bei 4°C) überführt und das Zellpellet verworfen. Im letzten Schritt wurde der Extraktionspuffer 4 (Raumtemperatur) + 5 µl Protease Inhibitor Cocktail zu den Zellen gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Extraktionspuffer 4 mit den enthaltenen Zellresten in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden dann bei - 20°C aufbewahrt. Pro Versuchsansatz wurden 100 µl Lysat mittels Chloroform-Methanol gefällt und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Zur Untersuchung der MRLCs wurden die entsprechenden Mengen Protein der einzelnen Fraktionen auf ein 14%iges Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden im semy-dry-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (45 min bei 15 V). Das Blocken der Membran erfolgte in I-Block für 60 min bei RT. Danach wurde die Membran 2 x 5 min in PBST gewaschen und dann mit dem 1. Antikörper (Anti-MLC, MY-21; 1:200) im Blocking-Puffer bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Anti-Maus Alkalische Phosphatase; 1:8000) für 1h bei RT. Zum Entwickeln des Blots wurde die Membran nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper 3 x 10 Minuten mit PBS-Tween gewaschen und dann nochmal 10 Minuten mit 1 x PBS. Die Membran wurde vor dem Entwickeln noch für 3 Minuten in Assay-Puffer (für Alkalische Phosphatase) eingelegt, um den benötigten pH-Bereich zu erreichen.

Die Blots wurden mit CDPStar Western Blotting System von Tropix entwickelt. Durch die Zugabe des Substrats kommt es zu einer kontinuierlichen Lichtemission an den Stellen des gebundenen Antikörpers, die zu einer Schwärzung eines aufgelegten Films führt. Die Belichtungszeit für alle entwickelten Filme betrug 15 Minuten. Der Film wurde dann in einer Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

2.8.3 Immunpräzipitierung der leichten Ketten des Myosins (MLC) aus dem Zelllysate von SH-SY5Y-Zellen zum Nachweis phosphorylierter MLC (p-MLC) im Western-Blot

24h vor Versuchsbeginn wurde den Zellen das alte Medium entzogen und durch frisches Medium mit Carcoal-stripped FCS ersetzt. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Inkubation der einzelnen Substanzen erfolgte in Serum-freiem Medium für 30 min bei 37°C.

Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden dann 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Hilfe eines Cell-Scrapers von der Schale gelöst und in 200 µl Solubilisierungspuffer aufgenommen. Das Lysat wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Eisbad wieder aufgetaut. Die Proben wurden durch 1 ml-Spritzen mit variierender Kanülengröße (0,9 x 40 mm; 0,7 x 32 mm; 0,4 x 21 mm) gezogen und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Immunpräzipitierung wurden die Proben aufgetaut, 5 min bei 100°C gekocht, kurz abzentrifugiert und mit PBS auf ein finales Volumen von 1,5 ml aufgefüllt und resuspendiert. 500 µl (1/3) der Probe wurden in einem

neuen Eppi mit weiteren 500 µl PBS verdünnt und auf Eis gelagert. Der Rest der Proben wurde wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

2.8.3.1 Äquilibrieren der Sepharose

Protein G-Sepharose wurde zunächst resuspendiert und 150 µl der Suspension in einem Eppi bei 4000 rpm und RT für 5 min abzentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet 2 x mit Wasser gewaschen. Der nächste Waschschrift des Pellets erfolgte mit 1 ml Solubilisierungspuffer (1:10 in PBS) und der Überstand wurde wieder verworfen. Nachfolgend wurden 1500 µl Solubilisierungspuffer auf das Pellet gegeben, resuspendiert und die Suspension à 100 µl auf 13 Eppis verteilt. 6 der Eppis wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen, die restlichen 7 Eppis für späteren Gebrauch zurückgestellt.

2.8.3.2 Klären der Proben

Die mit PBS verdünnten Proben wurden auf RT gebracht, kurz resuspendiert und auf die Sepharose-Pellets gegeben. Die Inkubation erfolgte 60 min bei RT auf einem „Überkopfschüttler“. Nach der Inkubation wurde der Überstand (850 µl) abgenommen.

2.8.3.3 Antikörperinkubation und Präzipitierung an Sepharose

Zum geklärten Überstand (außer Kontrolle) wurden 20 µl Antikörper (Anti-MLC) gegeben und 60 min auf dem „Überkopfschüttler“ bei RT inkubiert. Die Proben wurden dann zu der Sepharose-Suspension gegeben (Negativkontrolle: 765 µl PBS + 85 µl Solubilisierungspuffer + 20 µl AK) und 60 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden abzentrifugiert, die Pellets 3 x mit PBS gewaschen und dann in jeweils 30 µl Probenauftragspuffer für Schägger-Gel 5 min bei 100°C gekocht.

2.8.3.4 Schägger-Gel

Zur Auftrennung der MRLCs wurden sogenannte Schägger-Gele verwendet. Die Verwendung von Tricin anstelle von Glycin führt dabei zur besseren Auftrennung von kleinen Proteinen (v.a. 5-20 kDa). Die Gele bestehen aus einem Trenngel, einem Spacergel und einem Sammelgel (Schägger, 1987).

Anodenpuffer:	0,2 M Tris (pH=8,9)	
Kathodenpuffer:	0,1 M Tris (pH=8,25)	
	0,1 M Tricine	
	0,1% SDS	pH stellt sich von selbst ein

Gelpuffer: 3,0 M Tris (pH=8,45)
0,3% SDS

**Acrylamid-Bisacrylamid
(49,5% T, 6% C):** 46,5% (w/v) Acrylamid;
3,0% (w/v) Bisacrylamid

Probenpuffer: 4% SDS
12% Glycerol
50 mM Tris (pH=6,8)
2% Mercaptoethanol
0,01% Serva Blue G
+ H₂O

Gel	Acrylamid/ Bisacrylamid	Gelpuffer	H ₂ O	Glycerin	APS (10%)	Temed
Trenngel	1,67 ml	1,67 ml	5 ml	0,67 g	25 µl	2,5 µl
Spacergel	0,4 ml	0,67 ml	0,93 ml	-----	10 µl	1 µl
Sammelgel	0,4 ml	1,24 ml	3,36 ml	-----	25 µl	2,25 µl

Die Proteine wurden in 30 µl Probenpuffer aufgenommen und bei 40°C 30 min auf dem Theroschüttler inkubiert.

Das Schägger-Gel wurde ca. 45 min bei 30 V laufen gelassen, bis sich die Proben vollständig im Sammelgel befanden. Die Proben wurden bei 100 V (ca. 3h) aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend fixiert (evtl. Färben und Entfärben).

Fixieren: 50% Methanol
10% Essigsäure 1 Stunde

Färben: 0,025% Serva Blue G in
10% Essigsäure 2 Stunden

Entfärben: 10% Essigsäure 2 Stunden

Die Proteine wurden mittels des Tank-Blot-Verfahrens (100 V und 120 min) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

2.8.3.5 Nachweis von an Ser19 phosphorylierter MRLC

Das Blocken der Membran erfolgte über Nacht bei 4°C mit 3% BSA in TBST, die Waschschriffe wurden jeweils mit TBST durchgeführt. Die Membran wurde mit dem 1. Antikörper (Anti-pSer19; 1:100) 1h bei RT in Blocking-Puffer inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper (1:3000; 1h bei RT in Waschpuffer ohne BSA) verwendet. Die Entwicklung des Blots erfolgte mit dem SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Chemilumineszenz (1:1). Die Auswertung erfolgte mittels VersaDoc.

2.8.3.6 Nachweis der totalen MLCs

Zum Nachweis des Gesamtgehalts an MLCs wurde der Blot nach dem Strippen erneut über Nacht bei 4°C geblockt. Als Erstantikörper wurde Anti-MLC, Klon MY-21 (1h; bei RT; 1:200) verwendet. Als Zweitantikörper diente der oben beschriebenen Peroxidase-gekoppelte Antikörper. Die Entwicklung des Blots erfolgte ebenfalls mit dem SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Chemilumineszenz (1:1) und die Auswertung mittels VersaDoc.

2.8.3.7 „Cross-Linking“ von Proteinen

Bei Disuccinimidyl Suberate (DSS) handelt es sich um ein Kopplungsreagenz, das Moleküle mit einem max. Abstand von 11,4 Å miteinander koppelt. Die Kopplung mit DSS erfolgt über die primären Aminogruppen der Proteine. Erfolgt eine Kopplung von Proteinen, so kann man davon ausgehen, dass diese direkt miteinander interagieren.

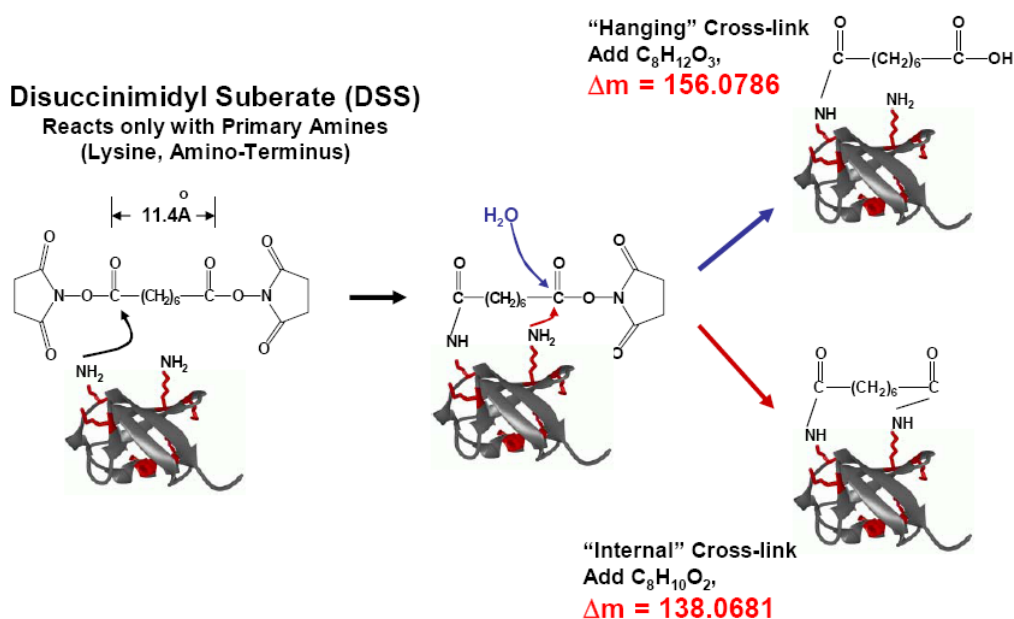


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Kopplung von primären Aminogruppen durch DSS.

Die Zellen wurden zur Kopplung der Proteine 40 min mit 1 mM DSS (in PBS) bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und sofort lysiert. Anschließend erfolgte die Fraktionierung der Proteine mit dem ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (siehe 2.8.2). Die Auswertung der Kopplungsversuche erfolgte mittels Western Blot.

2.9 Fluoreszenzmarkierung von Steroidhormonen

Die Fluoreszenzmarkierung von DHEA und Testosteron erfolgte über eine sogenannte „Pseudopeptidbindung“. Dabei reagiert eine an das jeweilige Steroid gekoppelte Carbonsäuregruppe mit einer an den Farbstoff gekoppelten primären Aminogruppe.

2.9.1. Aktivierung der an das Steroid gekoppelten Carbonsäuregruppe

2.9.1.1 Herstellung des aktivierenden „F-Komplexes“ (N,N'- Dicyclohexylcarbodiimide-Pentafluorophenol)

Man löst 1.87g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (9.055 mmol; 1eq) bzw. 5g 2,3,4,5,6-Pentafluorophenol (27.165 mmol; 3eq) im kleinstmöglichen Volumen n-Hexan (50 ml). Danach gibt man beide Lösungsgemische zusammen und schüttelt so lange, bis ein farbloses kristallines Addukt ausfällt. Das Präzipitat trennt man durch Filtrieren vom Lösungsmittel ab.

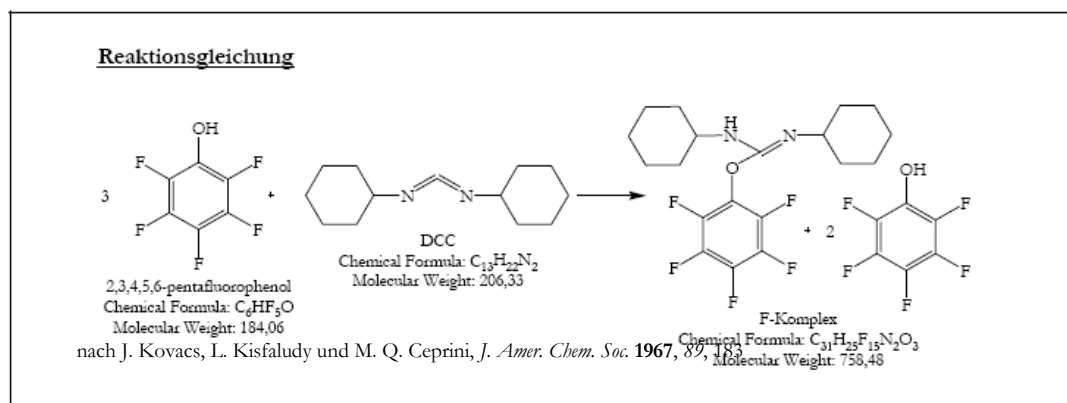


Abbildung 24: Reaktionsgleichung zur Herstellung des aktivierenden F-Komplex, nach J. Kovacs, L. Kisfaludy und M. Q. Ceprini, *J. Amer. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 183

2.9.2 Darstellung des DHEA-Bodipy-Pseudopeptids

2.9.2.1 Durchführung des Komplex-F-Verfahrens

1.5mg (4.047 µmol) Bodipy® (D2390) und 7mg (18.65 µmol; 4.6eq) DHEA-CMO werden in 3ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Dazu gibt man 1 ml eines auf pH 8.3 eingestellten

$\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ Puffers hinzu. Man kühlt die Lösung auf 0°C ab und gibt anschließend 61.39 mg (80.94 μmol ; 20eq) „Komplex-F“ zu. Nach 72-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch im Kühlschrank unter Lichtausschluss aufbewahrt.

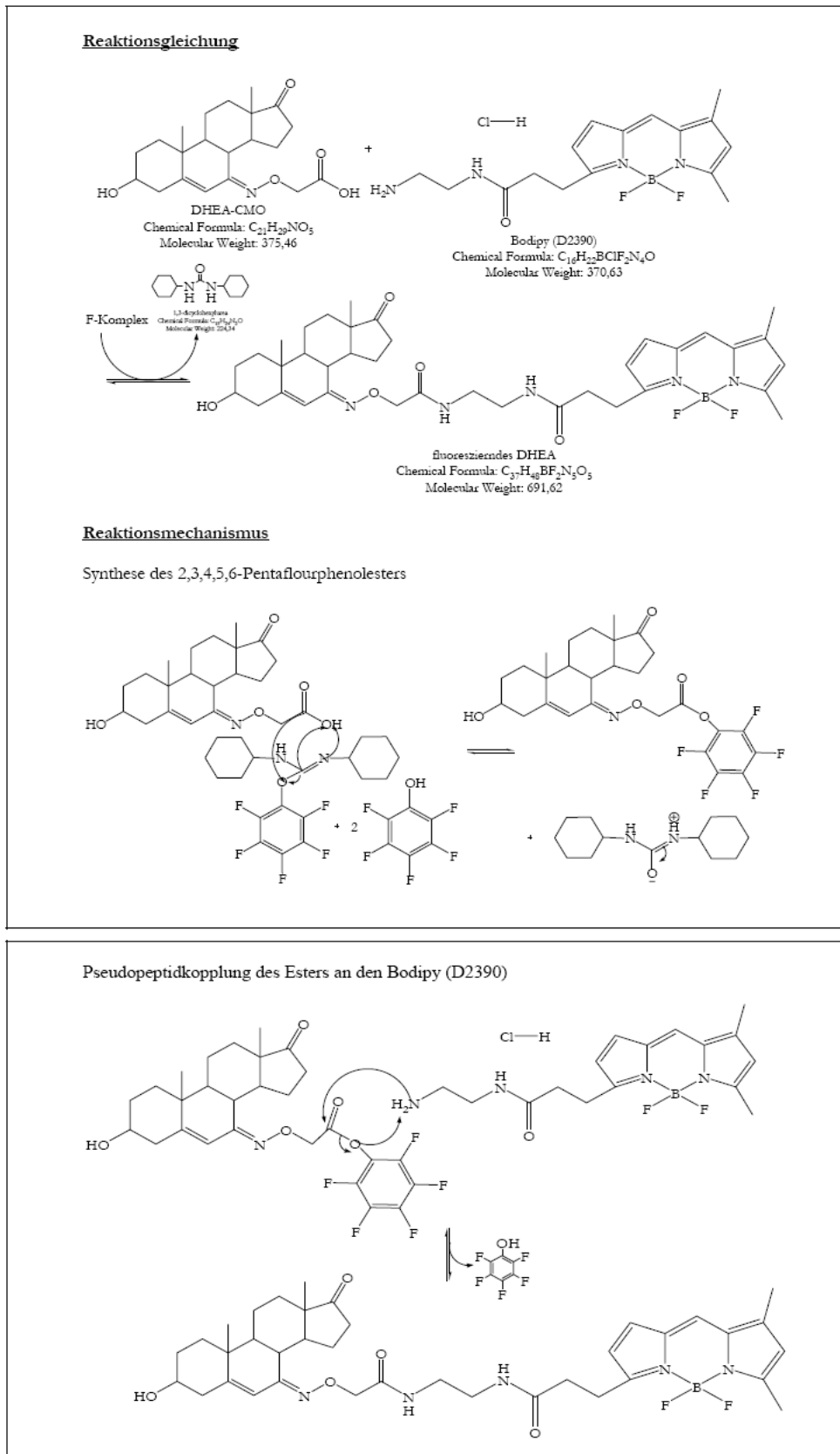


Abbildung 25: Reaktionsgleichungen zur Synthese von DHEA-Bodipy; oben: allgemeine Reaktionsgleichung und Synthese des 2,3,4,5,6-Pentafluorphenolesters; unten: Pseudopeptidkopplung des Esters an den Farbstoff Bodipy, Details siehe Text.

2.9.3 Darstellung des Testosteron-Bodipy-Pseudopeptids

2.9.3.1 Durchführung des Komplex-F-Verfahrens

1.5 mg (4.047 μmol) Bodipy® (D2390) und 7 mg (18.65 μmol ; 4.6eq) Testosteron-CMO werden in 3 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Dazu gibt man 1 ml eines auf pH 8.3 eingestellten $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ Puffers hinzu. Man kühlt die Lösung auf 0°C ab und gibt anschließend 61.39 mg (80.94 μmol ; 20eq) „Komplex-F“ zu. Nach 72-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch im Kühlschrank unter Lichtausschluss aufbewahrt.

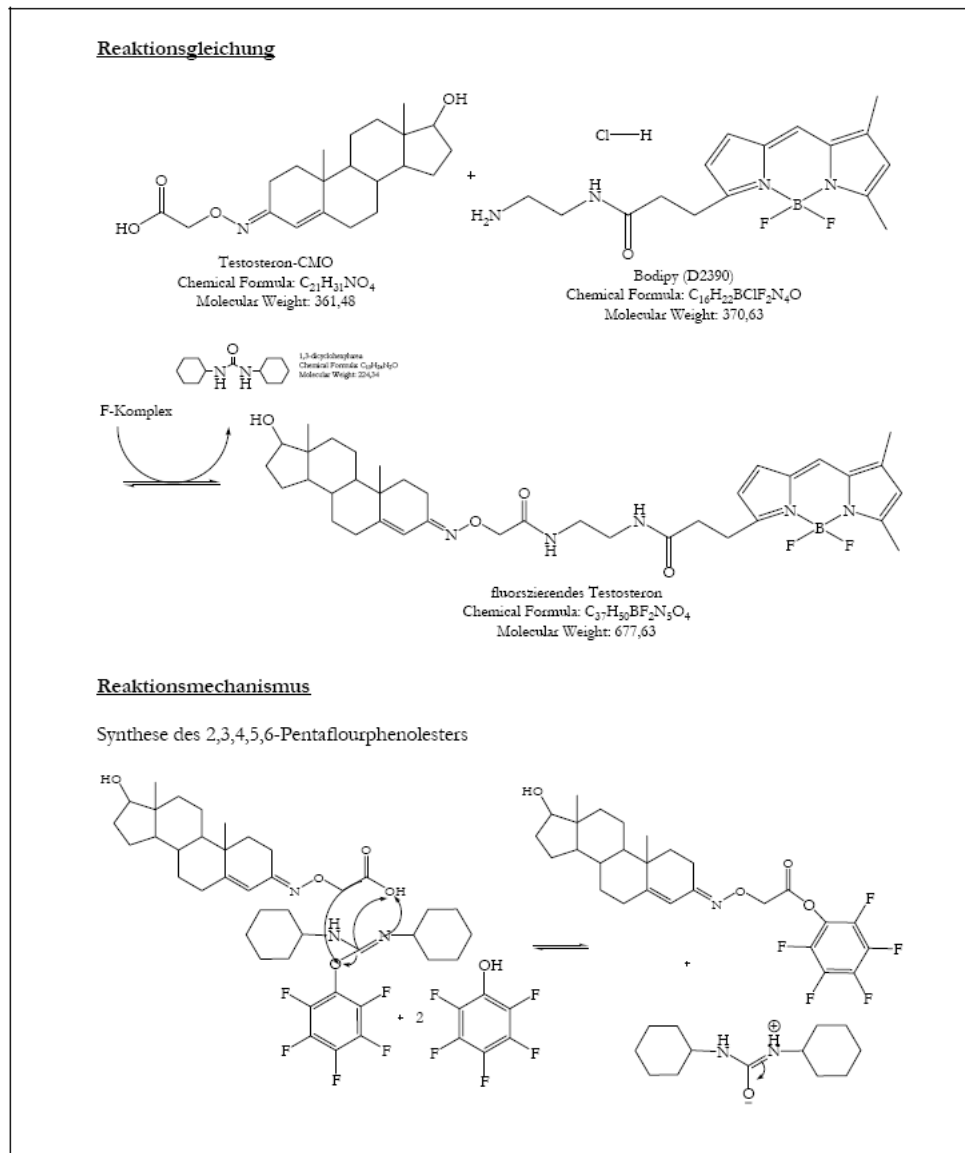


Abbildung 26: Reaktionsgleichungen zur Synthese von Testosteron-Bodipy; allgemeine Reaktionsgleichung und Synthese des 2,3,4,5,6-Pentafluorphenolesters; unten: Pseudopeptidkopplung des Esters an den Farbstoff Bodipy, Details siehe Text.

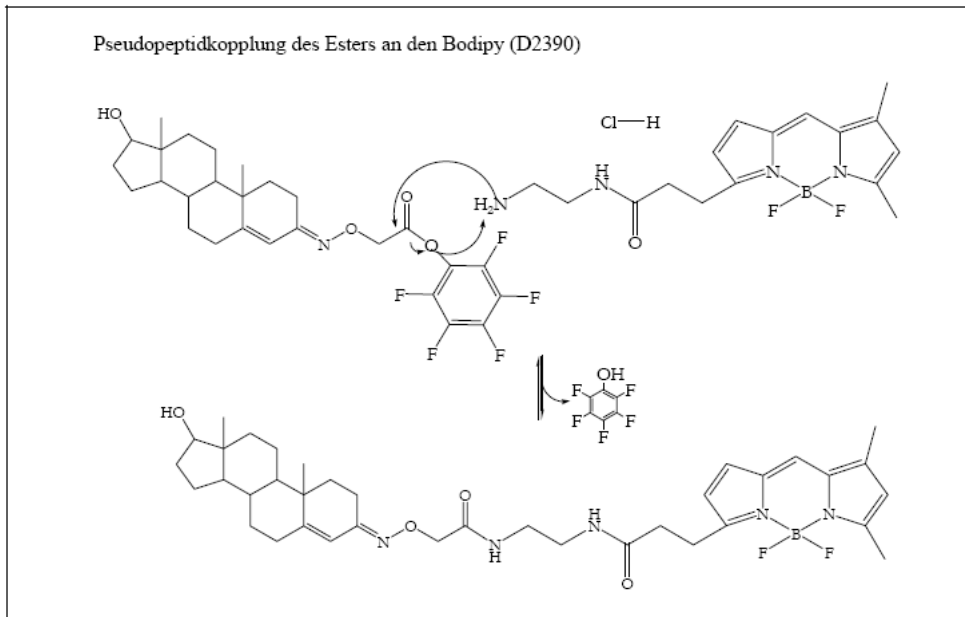


Abbildung 27: Reaktionsgleichung zur Synthese von Testosteron-Bodipy, Pseudopeptidkopplung des Esters an den Farbstoff Bodipy, Details siehe Text.

3.1. Eindeutige Zuweisung eines Effektes zu einem Steroid durch den Einsatz von Inhibitoren der Steroidsynthese

Die humane Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y ist ein gutes Modell immaturer Neuronen. Diese Zellen synthetisieren in vitro Proteine, die mit dem neuronalen Phänotyp identisch sind (z.B. Neuronen-spezifische Enolasen, Neurofilamente usw.), Rezeptoren für neuroaktive Faktoren und Enzyme für die Biosynthese von verschiedenen Neurotransmittern (Cholin-Acetyltransferase, Tyrosin-Hydroxylase, Dopamin- β -Hydroxylase). Dieser Zelltyp kann durch verschiedene Induktoren zu maturaen neuronalen Zellen differenziert werden. SH-SY5Y-Zellen differenzieren unter dem Einfluss von Retinolsäure zu einem cholinergen Zelltyp, mit TPA zu einem adrenergen Zelltyp. SH-SY5Y-Zellen reagieren deutlich auf Steroid-Signale, jedoch ist über ihren Steroidmetabolismus noch nicht viel bekannt. Die veröffentlichten Untersuchungen über den Steroidmetabolismus dieser Zellen fokussieren sich hauptsächlich auf den Bereich der Androgene. SH-SY5Y-Zellen können Progesteron zu 5 α -Dihydroprogesteron, bzw. Testosteron zu 5 α -Dihydrotestosteron und 17 β -Estradiol metabolisieren, da sie sowohl eine 5 α -Reduktase-Aktivität als auch eine P450 Aromatase-Aktivität aufweisen. Des Weiteren besitzen sie auch eine 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität, da sie 5 α -Dihydrotestosteron in 3 α -Diol (Androstandiol) umwandeln. Die Aktivitäten der 5 α -Reduktase und der P450 Aromatase werden durch Differenzierungsprozesse beeinflusst (Maggi, 1998).

Um die untersuchten charakteristischen morphologischen Effekte von Testosteron und DHEA eindeutig diesen Steroiden und nicht ihren Folgemetaboliten zuweisen zu können, wurden drei Inhibitoren der Steroidsynthese im Bereich der Androgene eingesetzt. Bei dem ersten Inhibitor handelt es sich um Formestan (4-hydroxy-4-en-3,17dion), einem Inhibitor der P450 Aromatase, der die Umwandlung von Testosteron in 17 β -Estradiol inhibiert. Aromatase-Inhibitoren lassen sich in zwei Klassen einteilen, in nicht-steroidale und steroidale Inhibitoren. Das eingesetzte Formestan gehört zu den steroidalen Inhibitoren, die die Aromatase irreversibel inhibieren (*"suicide effect"*). Das in der Versuchsreihe 3.2 eingesetzte Aminoglutethimid gehört zu den nicht-steroidalen, kompetitiven Aromatase-Inhibitoren der 1. Generation. Im Gegensatz zu Formestan handelt es sich bei Aminoglutethimid um einen nicht-selektiven Inhibitor der Aromatase, da neben der Produktion von Estrogenen auch die Produktion von Aldosteron und Cortison gehemmt wird. Steroidale Inhibitoren wie Formestan binden kovalent an die P450 Aromatase und besitzen eine sehr viel höhere Selektivität als Aminoglutethimid. Diese nicht-steroidalen Inhibitoren werden auch zur Bekämpfung von Mammacarcinomen eingesetzt (Santen, 1999).

Als zweiter Inhibitor wurde Finasterid verwendet, ein Inhibitor der 5 α -Reduktase I/II, der die Umwandlung von Testosteron in 5 α -Dihydrotestosteron inhibiert. SH-SY5Y-Zellen exprimieren nur die 5 α -Reduktase vom Typ I, welche im Vergleich zu Typ II relativ insensitive gegenüber Finasterid ist (Typ I $K_i=325$ nM; Typ II $K_i=12$ nM) (Maggi, 1998) (Lephart, 2001).

Als dritter Inhibitor wurde S(-)-1-naphthyl-1-ethanol eingesetzt, der die Aktivität der stereoselektiven Hydroxysteroid-Sulfotransferase ST2A3 inhibiert. Die Hydroxysteroid-Sulfotransferase 2A3 katalysiert die Sulfatierung von DHEA in DHEA-S (Duffel, 2003). SH-SY5Y Neuroblastomazellen wurden in verschiedenen Differenzierungsstadien mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt, um die Metabolisierung der Steroide in ihre jeweiligen Folgemetaboliten zu inhibieren und die morphologischen Effekte eindeutig den getesteten Steroiden zuordnen zu können. Die Auswertung dieser Versuchsreihe erfolgte zunächst anhand morphologischer Kriterien.

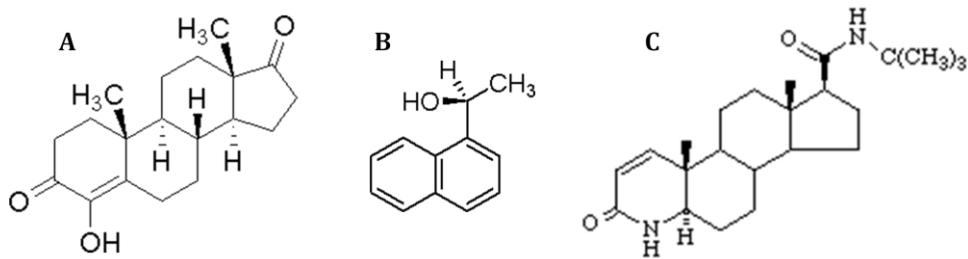


Abbildung 28: Strukturformeln der verwendeten Inhibitoren. (A) Formestan; (B) S(-)-1-naphthyl-1-ethanol; (C) Finasterid

3.1.1 Inhibierung der P450 Aromatase durch Formestan in SH-SY5Y Neuroblastomazellen

In den vorangegangenen Studien meiner Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Testosteron zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der SH-SY5Y Neuroblastomazellen führt. Diese Effekte werden zusätzlich vom Differenzierungsstatus der Zellen beeinflusst. Undifferenzierte SH-SY5Y Neuroblastomazellen bilden unter dem Einfluss von Testosteron lange Neuriten aus, in denen die Mikrotubuli gebündelt und in paralleler Anordnung vorliegen. Die am Ende der Neuriten lokalisierten Wachstumskegel sind ebenfalls gut zu erkennen. Mit steigender Differenzierung der Zellen treten zusätzliche morphologische Eigenschaften auf, die den Folgemetaboliten 5α -Dihydrotestosteron und 17β -Estradiol zugeordnet werden können. Meine Beobachtungen weisen daraufhin, dass Testosteron durch P450 Aromatase-Aktivität und 5α -Reduktase-Aktivität in seine Folgemetaboliten umgewandelt wird.

Um die Effekte auf das Cytoskelett eindeutig Testosteron zuordnen zu können und eine Metabolisierung auszuschließen, wurden die Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien vor der Testosteron-Inkubation mit dem P450 Aromatase-Inhibitor Formestan behandelt.

Die Untersuchungen der SH-SY5Y-Zellen mit dem Aromatase-Inhibitor Formestan wurden in verschiedenen Differenzierungsstadien durchgeführt. Neben den Kontrollen mit 0,1% EtOH wurden auch die möglichen Folgemetaboliten von Testosteron als Kontrollen herangezogen. Die charakteristischen morphologischen Merkmale dieser Steroide sind, abhängig vom Differenzierungsgrad, in Tabelle 1 zusammengefasst.

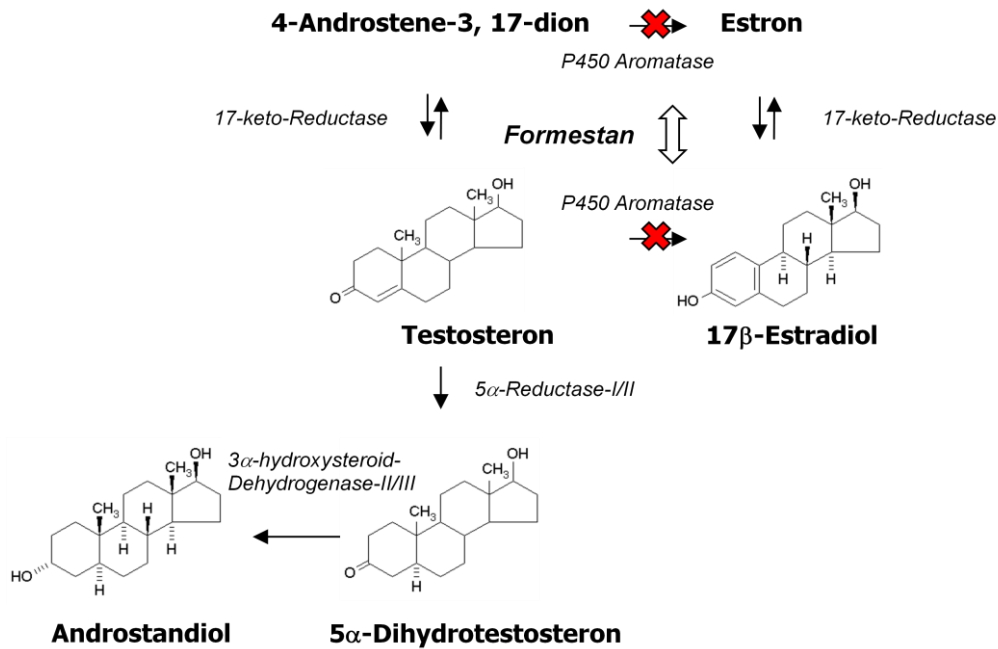


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Folgemetaboliten von Testosteron und der beteiligten Enzym-Systeme. Formestan inhibiert selektiv die Metabolisierung durch die P450 Aromatase. Die P450 Aromatase katalysiert neben der Umwandlung von Testosteron in 17β-Estradiol auch die Metabolisierung von 4-Androstene-3, 17-dion zu Estron.

Die neuronalen Zellen wurden entsprechend den in 2.4.2.2.1 angegebenen Differenzierungsprotokollen differenziert und dann entsprechend in Serum-freiem Medium mit den Steroiden, Formestan oder in Kombination mit diesem behandelt. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Mikrotubuli.

Überraschenderweise führt die alleinige Inkubation undifferenzierter SH-SY5Y mit dem P450 Aromatase-Inhibitor Formestan (24h 10 µM Formestan + 30 min 0,1% EtOH) zur Ausbildung von Neuriten mit spezifischen Enden (**Bild 1 G**). Die Länge der Neuriten ist jedoch im Vergleich zu Testosteron-behandelten Zellen (**Bild 1 C**) wesentlich kürzer. Die Enden der Neuriten zeigen die Form eines Wachstumskegels, jedoch sind die transparent wirkenden Flächen stark vergrößert. In der Vergrößerung ist gut zu erkennen, dass in diesem Bereich nur noch vereinzelt Mikrotubuli vorliegen und es scheinbar zu einer Regression der Mikrotubuli in Richtung des Zellkörpers kommt (**Bild 1 H**). Diese Effekte treten normalerweise nur nach einer Behandlung der Zellen mit 5α-Dihydrotestosteron auf und stellen ein besonderes Charakteristikum dieses Steroids dar (vergleiche **Bild 1 I**). Des Weiteren kommt es zur vermehrten Bildung von Zell-Zell-Kontakten, wodurch die Zellen stärker miteinander vernetzt werden (**Bild 1 G**).

Eine Kombination von Formestan und Testosteron (24h 10 µM Formestan + 30 min 30 µM Testosteron) führt zur Ausbildung von Testosteron- und 5α-Dihydrotestosteron-spezifischen Merkmalen. Es kommt sowohl zur Bildung von langen Neuriten und Zellverzweigungen als auch zur Regression der Mikrotubuli im Bereich der Wachstumskegel (**Bild 1 J-L**).

Tabelle 1

Steroid	Charakteristische morphologische Merkmale der Kontrollsteroiden im jeweiligen Differenzierungsstatus			
	undifferenziert (UD)	andifferenziert (AD)	mitteldifferenziert (MD)	hochdifferenziert (HD)
0,1% EtOH 30 min	Zellform: trapezoid/dreieckig	Zellform: trapezoid/dreieckig	Zellform: trapezoid/selten langgestreckt	Zellform: trapezoid/langgestreckt
0,1% EtOH 24,5 h	Zellform: trapezoid/dreieckig	Zellform: trapezoid/dreieckig	Zellform: trapezoid/selten langgestreckt	Zellform: trapezoid/langgestreckt
30 μ M Testosteron 30 min	Zellform: langgestreckt Neuriten (asymmetrisch); Wachstumskegel mit Lamellipodien	Zellform: wie UD + vermehrt Zell-Zell- Kontakte; vereinzelt	Zellform: wie AD lange Neuriten , vermehrt Zell-Zell- Kontakte; auch trigonale Formen mit Filopodien	Zellform: langgestreckt und trigonal + 5α-DHT- und 17β- Estradiol-Merkmale
30 μ M 5 α - DHT 30 min	Zellform: polygonal kürzere Neuriten , Wachstumskegel stark vergrößert und transparent erscheinend	wie UD	wie UD	Zellform: langgestreckt wie UD +langgestreckt
30 μ M 17 β - Estradiol 30 min	Zellform: trigonal/abgerundet; lange, abgerundete Filopodien , Verteilung über ges. Oberfläche	wie UD	Zellform: selten langgestreckt wie UD, selten langgestreckt	wie MD, Enden breit
30 μ M Androstandiol 30 min	Zellform: lang stark verzweigte Neuriten , an den Enden Filopodien mit dornigem Charakter	wie UD +lateral lokalisierte, hell fluoreszierende, punktförmige Gebilde	wie UD, Filopodien sehr lang; Zellen stark vernetzt	Zellform: langgestreckt, symmetrisch, spitz; Filopodien nur auf einer Seite

Merkmale des Folgemetabolits 17 β -Estradiol (**Bild 1 E-F**) treten nicht auf. Da es bei der alleinigen Behandlung mit Formestan, sowie in Kombination mit Testosteron, zum Auftreten von Testosteron- und 5 α -Dihydrotestosteron-Charakteristika kam, konnte eine Umwandlung des zugesetzten Testosterons in 5 α -Dihydrotestosteron nicht ausgeschlossen werden. Diese Umwandlung könnte durch die Inhibierung der P450 Aromatase induziert werden, da nicht auszuschließen ist, dass es durch die Inhibierung der P450 Aromatase zu einer Aktivitätssteigerung der 5 α -Reduktase kommt. Da dies auch die Enzymsysteme der

Folgemetaboliten betreffen könnte, wurden zusätzlich die Merkmale des 5 α -Dihydrotestosteron-Folgemetabolits Androstandiol an SH-SY5Y-Zellen untersucht und sollen hier kurz vorgestellt werden. Als typische Merkmale von Androstandiol in diesem Differenzierungsstadium wurden stark verzweigte Neuriten beobachtet.

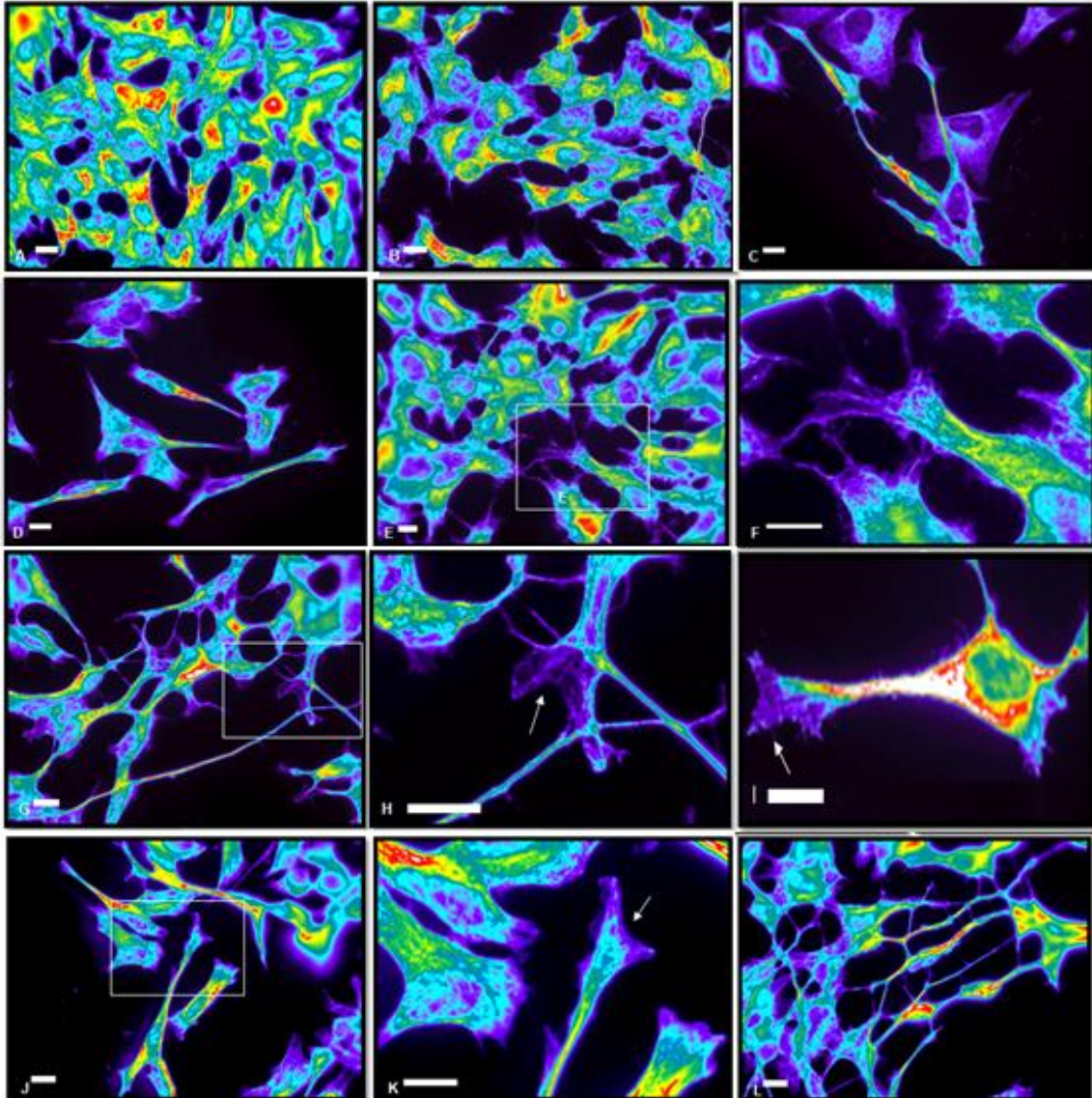


Bild 1: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. **(A)** 0,1% EtOH für 24,5h; **(B)** 0,1% EtOH für 30 min; **(C-D)** 30 μ M Testosteron für 30 min; **(E)** 30 μ M 17 β -Estradiol für 30 min; **(F)** vergrößerter Ausschnitt aus (E), Pfeile deuten auf die Filopodien der Estradiol-Behandlung hin; **(G)** 24h 10 μ M Formestan + 30 min 0,1% EtOH; **(H)** vergrößerter Ausschnitt aus (G), der Pfeil zeigt die spezifischen Enden mit transparenten Charakteristika, wie sie nach der Behandlung mit 5 α -Dihydrotestosteron auftreten (siehe (I)); **(I)** Ausschnitt aus 30 min 5 α -Dihydrotestosteron 30 μ M; **(J)** 24h 10 μ M Formestan + 30 min Testosteron 30 μ M; **(K)** vergrößerter Ausschnitt aus (J), der Pfeil zeigt die spezifischen Enden mit transparenten Charakteristika, wie sie eigentlich nur nach der Behandlung mit 5 α -Dihydrotestosteron auftreten (siehe (I)); **(L)** zeigt die Zell-Zell-Kontakte, die durch die Neuriten geknüpft werden, wenn die Zellen mit 24h 10 μ M Formestan + 30 min Testosteron 30 μ M behandelt werden. Balken: 10 μ m

Die Neuriten sind glatt und auch hier liegen die Mikrotubuli in gebündelter, paralleler Anordnung vor. An den Enden der Neuriten bilden sich jedoch zusätzlich lange Filopodien aus, die den durch 17 β -Estradiol induzierten Filopodien sehr ähnlich sind und schwer zu unterscheiden. Im Gegensatz zu den durch 17 β -Estradiol induzierten Filopodien (**Bild 2 P**),

erstrecken sie sich aber nicht über die gesamte Zelloberfläche und zeigen einen eher dornigen, spitzen Charakter. Sie sind meist länger, und die transparent wirkenden Strukturen zwischen den einzelnen Ausläufern fehlen (**Bild 2 M-O**). Diese Strukturen konnten in diesem Differenzierungsstadium nach der Behandlung mit Formestan nicht beobachtet werden.

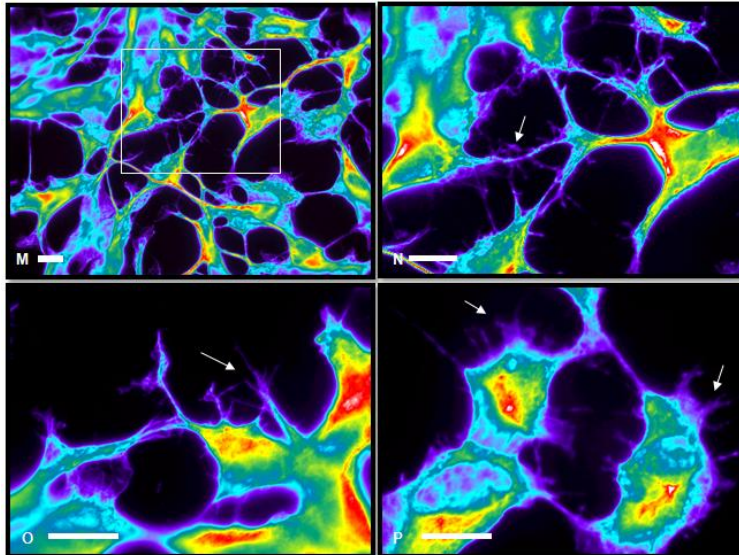


Bild 2: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. **(M)** 30 min Androstadiol 30 μM ; **(N)** vergrößerter Ausschnitt aus **(M)**, Pfeil zeigt die langen Filopodien an Neuriten-ähnlichen Hauptausläufern mit eher dornigem Charakter im Vergleich zu **(P)**; **(O)** 30 min Androstadiol 30 μM , 100x vergrößert, Enden der Ausläufer sind nicht abgerundet. **(P)** 30 min Estradiol 30 μM , Pfeile zeigen hier ebenfalls Filopodien. Diese sind jedoch im Vergleich zu **(O)** über die gesamte Zelloberfläche verteilt und eher abgerundet, zwischen den einzelnen Filopodien sind transparente Strukturen zu erkennen. Balken: 10 μm

Formestan induziert bei andifferenzierten Zellen erneut 5 α -Dihydrotestosteron-spezifische Merkmale. Die Zellen bilden lange Neuriten, an deren Enden sich die für 5 α -Dihydrotestosteron spezifischen transparent wirkenden Strukturen bilden, in denen die Mikrotubuli nur noch vereinzelt vorliegen (**Bild 3 I-J**).

Die Kombination von Formestan und Testosteron führt bei andifferenzierten SH-SY5Y-Zellen einerseits zur Ausbildung von langen Neuriten mit 5 α -Dihydrotestosteron-Merkmalen (**Bild 3 K-L**), andererseits sind aber auch trigonale Zellformen zu beobachten, die die für Androstadiol typischen Merkmale aufweisen. Diese Zellen zeigen dann Filopodien mit dornigem Charakter. Die Ausläufer treten besonders zahlreich an den lateralen Enden der Zellen auf (**Bild 3 M-N**). Ebenfalls sind die für Androstadiol typischen fluoreszierenden, punktförmigen Gebilde zu erkennen (**Bild 3 O**). Dies deutet auf eine gesteigerte Metabolisierung von Testosteron zu 5 α -Dihydrotestosteron und Androstadiol bei inhibierter P450-Aromatase hin.

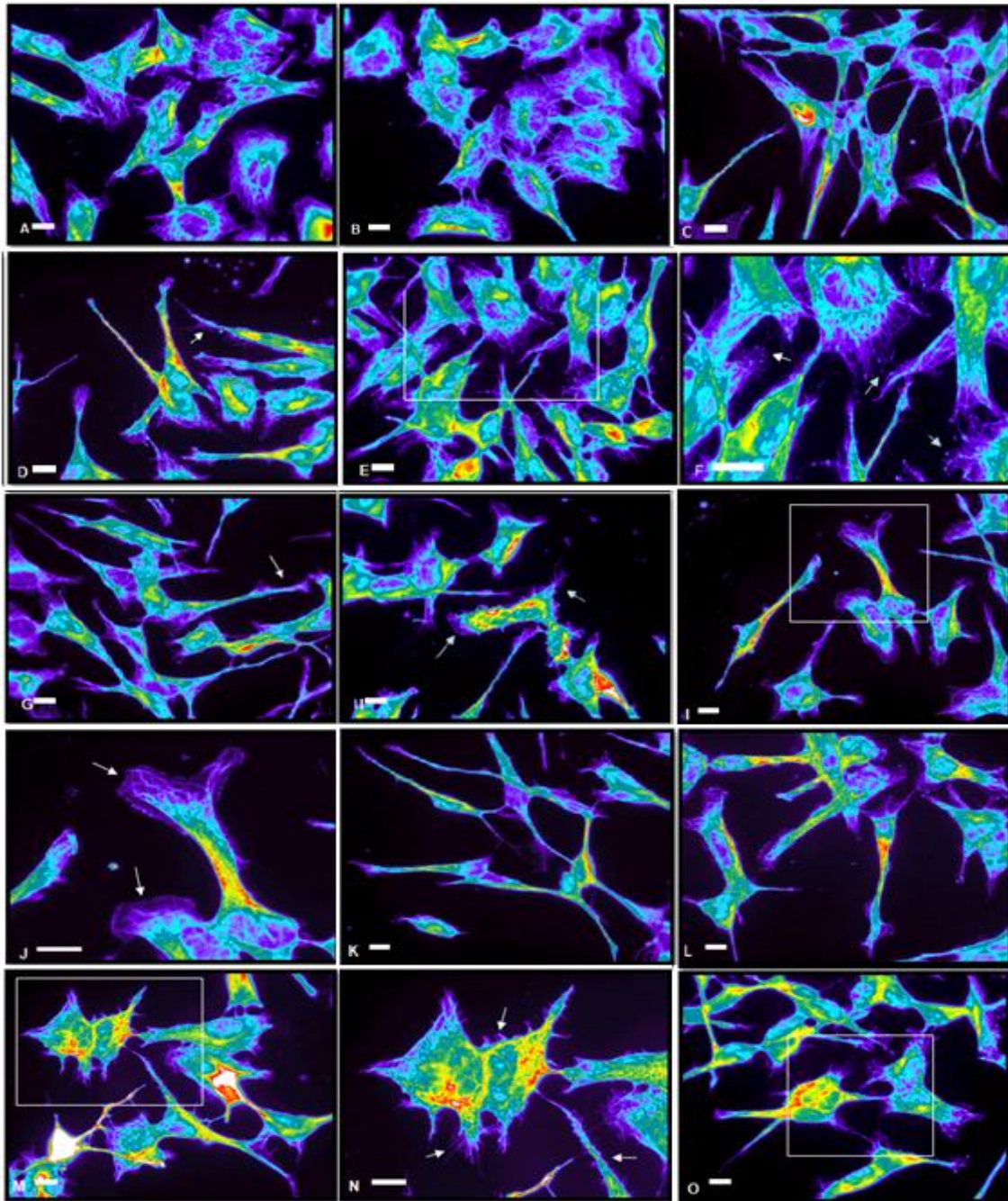


Bild 3: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. **(A)** 0,1% EtOH, 30 min; **(B)** 0,1% EtOH, 24,5 h; **(C)+(D)** 30 min Testosteron 30 μ M; **(C)** zeigt die Neuriten, **(D)** Pfeil zeigt Filopodien mit Estradiol-Charakter, die in diesem Differenzierungsstadium vereinzelt auftreten; **(E-G)** 30 min Androstadiol 30 μ M; **(F)** vergrößerter Ausschnitt aus (E), Pfeile deuten auf fluoreszierende, punktförmige Gebilde hin, die an den lateralen Enden der Zellen lokalisiert sind. **(G)** Pfeil zeigt Neuriten mit spezifischen Enden; **(H)** 30 min Estradiol 30 μ M, Pfeile zeigen abgerundete Filopodien, die über die gesamte Zelloberfläche verteilt sind; **(I)** 24h Formestan + 30 min 0,1% EtOH. **(J)** vergrößerter Ausschnitt aus (I); Pfeile deuten auf die für 5 α -Dihydrotestosteron-spezifischen transparent wirkenden Strukturen, die Mikrotubuli liegen vereinzelt vor; **(K)+(L)** 24h Formestan + 30 min Testosteron 30 μ M. **(K)** zeigt die langen, Neuriten mit 5 α -Dihydrotestosteron-Merkmalen an den Enden der Zellausläufer; **(M)-(P)** 24h Formestan + 30 min Testosteron 30 μ M; **(M)** zeigt die trigonalen Zellformen mit Androstadiol-spezifischen Merkmalen. **(N)** vergrößerter Ausschnitt aus (M), die Pfeile zeigen die Filopodien mit dornigem Charakter, die sich über die gesamte Zelloberfläche erstrecken; **(O)** zeigt Filopodien mit dornigem Charakter und fluoreszierende, punktförmige Gebilde, wie sie eigentlich für Androstadiol typisch sind. Balken: 10 μ m

Testosteron induziert im mitteldifferenzierten Stadium, bei aktiver P450-Aromatase, die für Testosteron typischen langen Neuriten. Die Neuriten gehen sehr viele Zell-Zell-Kontakte ein, so dass die Zellen untereinander stark vernetzt sind (**Bild 4 G**). Weiterhin treten auch

trigonale Zellformen auf, die die für Estradiol typischen Filopodien besitzen (**Bild 4 H**) und auf eine verstärkte Metabolisierung von Testosteron in Estradiol hinweisen.

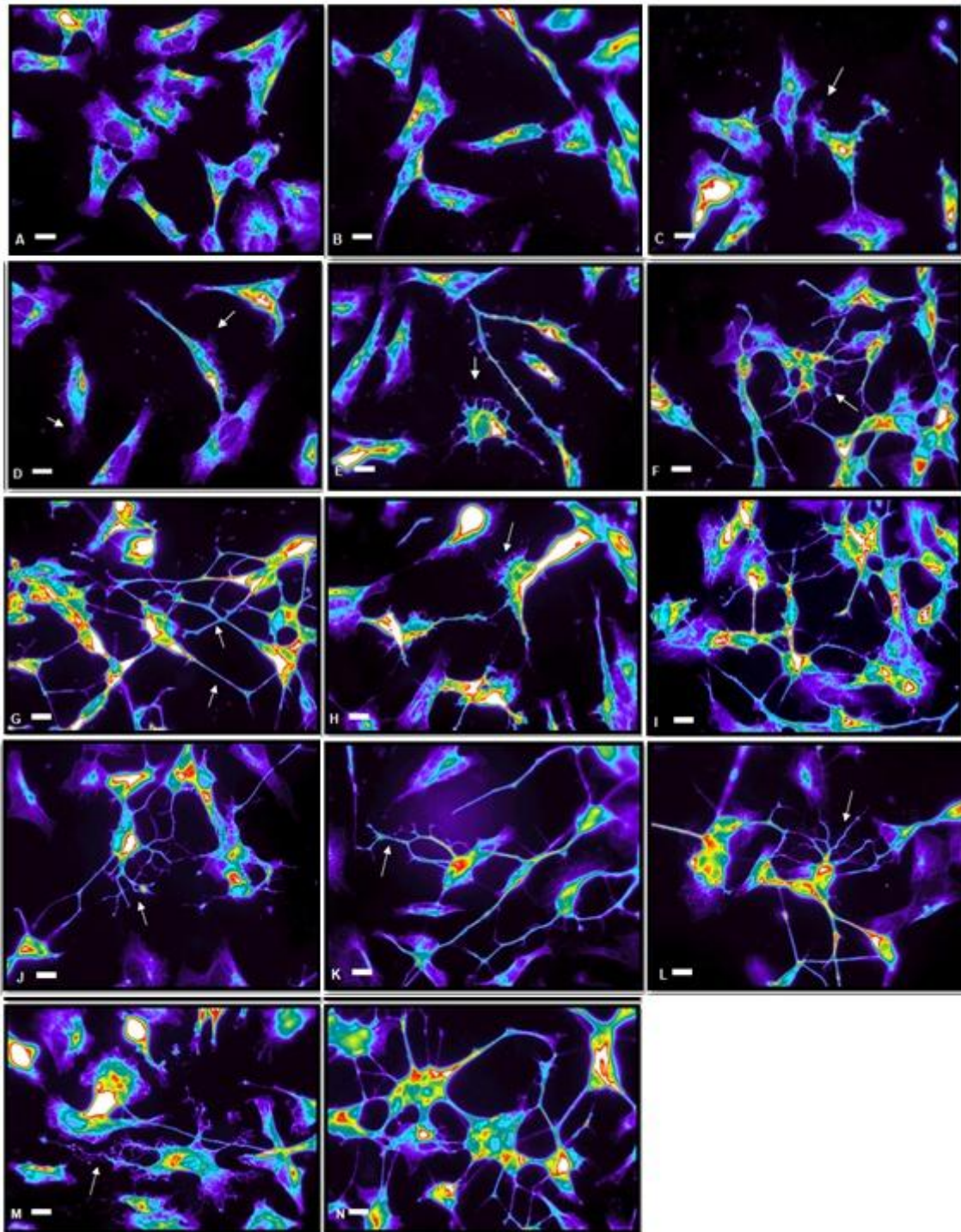


Bild 4: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. **(A)** 0,1% EtOH, 30 min; **(B)** 0,1% EtOH, 24,5 h; **(C)+(D)** 30 min 17 β -Estradiol 30 μ M; die Pfeile zeigen auf die abgerundeten Filopodien. **(E)+(F)** 30 min Androstandiol 30 μ M; der Pfeil in **(E)** zeigt extrem lange Filopodien mit dornigem Charakter. Pfeil in **(F)** zeigt auf die starke Quervernetzung in diesem Stadium; **(G)+(H)** 30 min Testosteron 30 μ M; Pfeile in **(G)** zeigen auf die langen Neuriten und die starke Quervernetzung. **(H)** Pfeil zeigt auf trigonale Zellformen mit Estradiol-Merkmalen; **(I)+(J)** 24h Formestan + 30 min 0,1% EtOH; Pfeil in **(J)** zeigt die starke Quervernetzung der Zellen; **(K)-(N)** 24h Formestan + 30 min Testosteron 30 μ M; Pfeile in **(K)** und **(L)** zeigen auf die stark verzweigten Neuriten. **(N)** zeigt die zahlreichen Zell-Zell-Kontakte. Pfeil in **(M)** zeigt die unspezifischen Zellformen mit typischen Merkmalen von Androstandiol in Form von zahlreichen Filopodien an den Hauptausläufern. Balken: 10 μ m

Die Behandlung mit Formestan induziert eine starke Quervernetzung der Zellen und teilweise auch Filopodien an den langgestreckten Neuriten (**Bild 4 I-J**), wie sie in diesem Stadium auch nach der Behandlung von Androstandiol zu beobachten sind.

Diese Zellstrukturen sind in Kombination mit Testosteron besonders stark ausgeprägt. Die Zellen bilden sehr lange Neuriten, die sehr stark miteinander vernetzt sind und zahlreiche Zell-Zell-Kontakte eingehen (**Bild 4 K-L, N**).

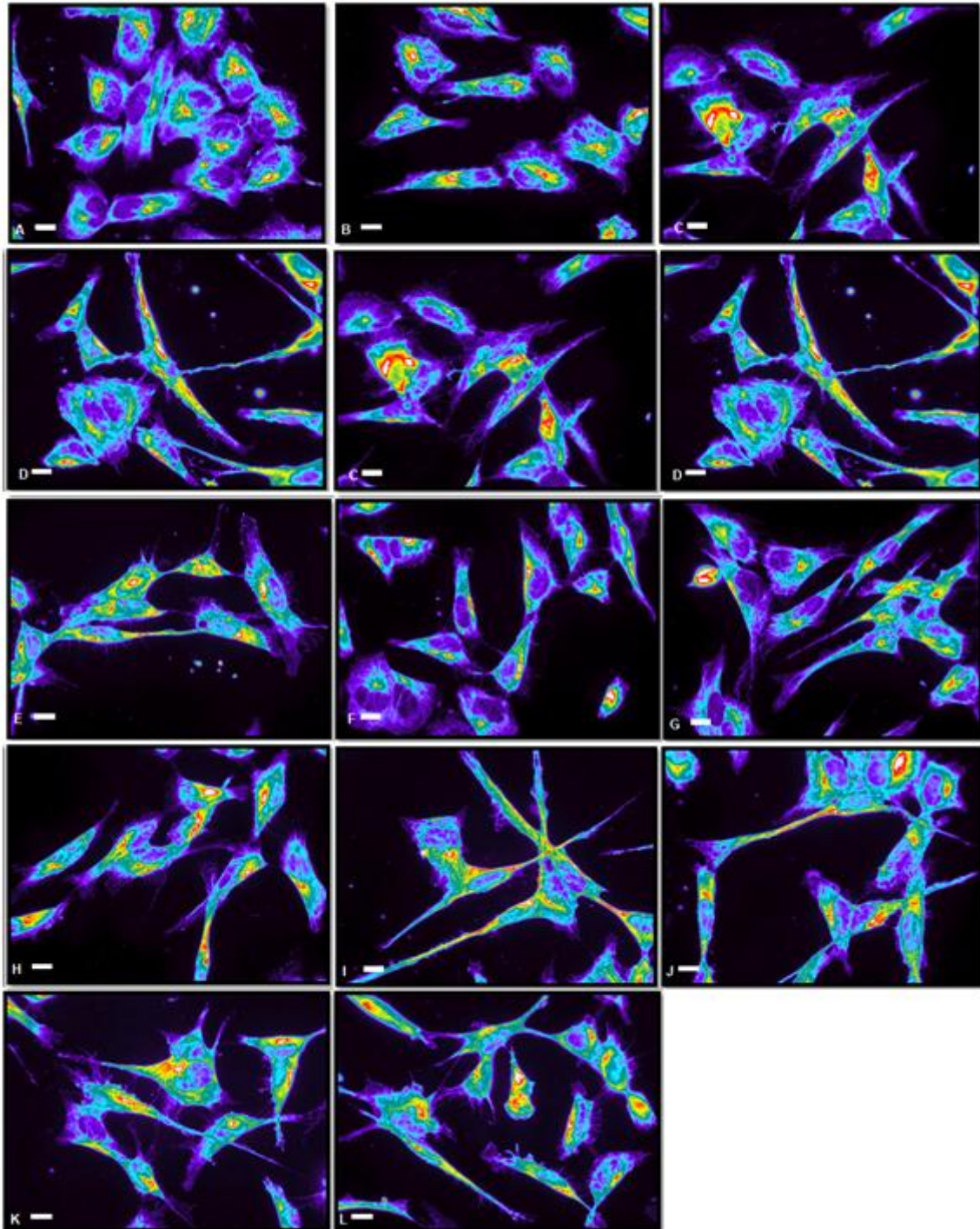


Bild 5: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. **(A)** 0,1% EtOH, 30 min; **(B)** 0,1% EtOH, 24,5 h; **(C)-(E)** 30 min Androstandiol 30 μ M; **(F)** 30 min 17 β -Estradiol 30 μ M; **(G)+(H)** 30 min Testosteron 30 μ M; **(G)** zeigt die durch Testosteron induzierten langen Neuriten mit 5 α -Dihydrotestosteron-Merkmalen. **(H)** zeigt trigonale Zellformen mit Filopodien, wie sie für Estradiol typisch sind; **(I)-(J)** 24h Formestan + 30 min 0,1% EtOH; **(K)-(L)** 24h Formestan + 30 min Testosteron 30 μ M. Balken: 10 μ m

Zusätzlich kommen auch noch unspezifische Zellformen mit mehreren Zellausläufern hinzu, die ihrerseits wiederum Filopodien aufweisen, wie sie für Androstadiol typisch sind (**Bild 4 M**).

Im ausdifferenzierten Stadium induziert Testosteron, bei aktiver P450-Aromatase, sowohl Testosteron- und 5 α -Dihydrotestosteron-spezifische Merkmale, als auch Estradiol-spezifische Strukturen. Es treten sowohl Zellen mit langen Neuriten (**Bild 5 G**), als auch trigonale Zellformen mit Filopodien auf (**Bild 5 H**).

Formestan führt zur Bildung sehr langer Neuriten mit 5 α -Dihydrotestosteron-spezifischen Enden. Die Zellen weisen auch Strukturen von Androstadiol auf, da die Ausläufer teilweise spitz zulaufen. Neben diesen Zellformen tauchen auch trigonale Zellformen mit Filopodien auf, die meist nur auf eine Zellseite beschränkt sind (**Bild 5 I-J**). In Kombination mit Testosteron werden diese Strukturen deutlich verstärkt. Es ist gut zu erkennen, dass die Filopodien nur auf einer Zellseite auftreten und diese nicht, wie bei Estradiol, abgerundet sind, sondern den für Androstadiol typisch dornigen Charakter aufweisen (**Bild 5 K-L**).

Zusammenfassung: Testosteron induziert in SH-SY5Y-Zellen das Auswachsen langer Neuriten mit gut erkennbaren Wachstumskegeln. In höher differenzierten Stadien kommt es nach Behandlung der Zellen mit Testosteron aber auch u.a. zur Bildung von 17 β -Estradiol spezifischen Merkmalen. Um die Metabolisierung von Testosteron in 17 β -Estradiol durch die P450 Aromatase zu inhibieren, wurden die Zellen vor der Inkubation mit Testosteron mit Formestan behandelt. Die alleinige Behandlung der Zellen mit Formestan führt in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums zur Ausbildung von 5 α -DHT- und Androstadiol-spezifischen Merkmalen. Die Kombination von Formestan und Testosteron führt zu einer Verstärkung dieser Effekte. Diese Ergebnisse zeigen zum Einen, dass die morphologischen Effekte eindeutig Testosteron zugewiesen werden können, da es nach Einsatz des Inhibitors zu keiner Ausbildung 17 β -Estradiol-spezifischer Merkmale kommt. Durch die Inhibierung der P450 Aromatase kommt es jedoch zur Ausbildung von Merkmalen, die den Folgemetaboliten 5 α -DHT und Androstadiol zugewiesen werden können. Die Untersuchung einer evtl. Metabolisierung des Inhibitors Formestan wird unter 3.2 gezeigt.

3.1.2 Inhibierung der 5 α -Reduktase I durch Finasterid in SH-SY5Y Neuroblastomazellen

Im Gegensatz zur P450 Aromatase wandelt die 5 α -Reduktase verschiedene Δ -4, 3 Keto-Steroide (z.B. Androgene, Progestagene und Glucocortikoide) in ihre 5 α -reduzierten Metaboliten um. Für die 5 α -Reduktase-Aktivität sind zwei Enzyme verantwortlich. Es gibt den 5 α -Reduktase Typ1 und Typ2. Beide Enzyme katalysieren jedoch die gleiche Reaktion. Typ1 und 2 Enzyme unterscheiden sich durch ihre pH-Optima. Typ1 Enzyme haben ihren optimalen pH-Bereich bei 6,0-8,5 und einen K_m -Wert von 1-5 μ M, Typ2 Enzyme haben ihren optimalen pH-Bereich bei 5,5 und einen K_m -Wert von 0,1-1,0 μ M. SH-SY5Y

Neuroblastomazellen exprimieren nur den 5 α -Reduktase Typ 1 (Lephart, 2001). Die irreversible Reduktion von Testosteron führt zur Bildung von 5 α -Dihydrotestosteron. Im vorangegangenen Abschnitt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in höher differenzierten Stadien der Zellen die Behandlung von Testosteron nicht nur zur Ausbildung von Estradiol-spezifischen Merkmalen führt, sondern auch zum Auftreten von 5 α -Dihydrotestosteron-spezifischen Merkmalen. Um eine Weitermetabolisierung von Testosteron in 5 α -Dihydrotestosteron zu verhindern, wurde die Aktivität der 5 α -Reduktase mit Finasterid inhibiert. Die Effekte von Finasterid wurden nur an mitteldifferenzierten Zellen getestet, da die Effekte von 5 α -Dihydrotestosteron erst im mitteldifferenzierten Stadium auftreten. Auf eine Untersuchung an ausdifferenzierten Zellen wurde verzichtet, da es in diesem Stadium zu einer Maskierung der 5 α -Dihydrotestosteron-Merkmale durch Estradiol-Merkmale kommt.

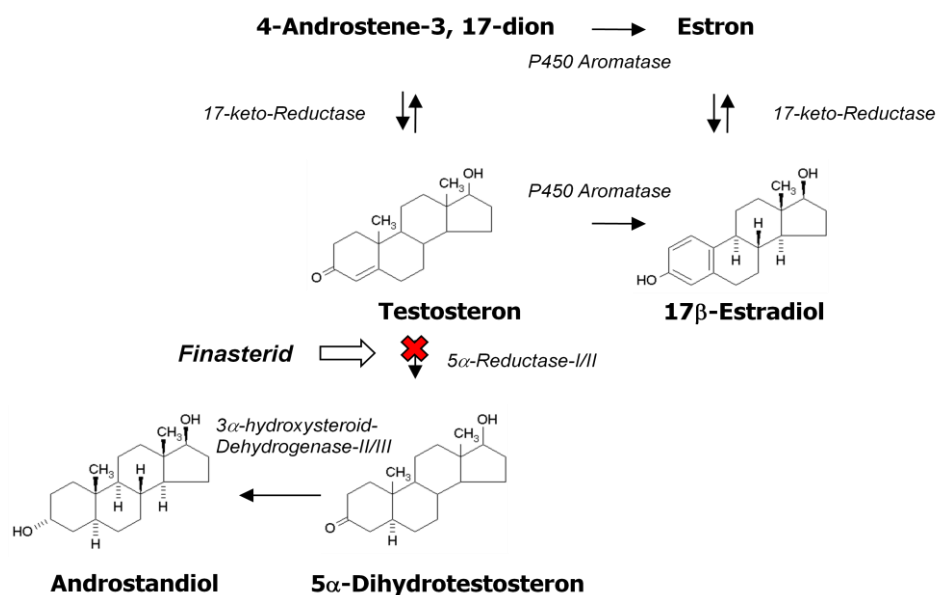


Abbildung 30: Darstellung der Folgemetaboliten von Testosteron und den beteiligten Enzym-Systemen. Finasterid inhibiert selektiv die irreversible Metabolisierung von Testosteron zu 5 α -Dihydrotestosteron durch die 5 α -Reduktase.

Die Untersuchungen der SH-SY5Y-Zellen mit dem 5 α -Reduktase-Inhibitor Finasterid wurde im mitteldifferenzierten Differenzierungsstadium durchgeführt. Neben den Kontrollen mit 0,1% EtOH wurden auch die möglichen Folgemetaboliten von Testosteron als Kontrollen herangezogen. Die charakteristischen morphologischen Merkmale dieser Steroide sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die neuronalen Zellen wurden entsprechend dem in 2.4.2.2.1 angegebenen Differenzierungsprotokoll differenziert und dann entsprechend in Serum-freiem Medium mit den Steroiden, Finasterid oder in Kombination mit diesem behandelt. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Mikrotubuli.

Tabelle 2

Steroid	Charakteristische morphologische Merkmale der Kontrollsteroidoide im jeweiligen Differenzierungsstatus	
	mitteldifferenziert (MD)	
0,1% EtOH 30 min	Zellform: trapezoid/selten langgestreckt	
0,1% EtOH 24,5 h	Zellform: trapezoid/selten langgestreckt	
30 μ M Testosteron 30 min	Zellform: langgestreckt lange Neuriten (asymmetrisch), vermehrt Zell-Zell-Kontakte; auch trigonale Formen mit Filopodien	
30 μ M 5 α -DHT 30 min	Zellform: langgestreckt kürzere Neuriten , Wachstumskegel stark vergrößert und transparent erscheinend	
30 μ M 17 β -Estradiol 30 min	Zellform: trigonal/ selten langgestreckt lange, abgerundete Filopodien , Verteilung über ges. Oberfläche	
30 μ M Androstendion 30 min	Zellform: langgestreckt Neuriten (symmetrisch);	
30 μ M Estron 30 min	Zellform: langgestreckt lange Neuriten	

Finasterid induziert das Auftreten von trigonalen Zellformen mit Filopodien, die sich über die gesamte Zelloberfläche erstrecken (**Bild 6 H**). Dieser Effekt wird in Kombination mit Testosteron noch verstärkt. Es treten Filopodien mit Estradiol-Charakter auf, da die Filopodien abgerundet sind und die typischen transparenten Zwischenräume aufweisen (**Bild 6 I**). In beiden Fällen sind keinerlei 5 α -Dihydrotestosteron-spezifische Merkmale zu detektieren. Diese morphologischen Veränderungen deuten darauf hin, dass es nach der Inhibierung der 5 α -Reduktase zur Metabolisierung endogenem und exogenem Testosterons durch die P450 Aromatase in 17 β -Estradiol kommt. Das Auftreten von Estron- und Androstendion-spezifischen Merkmalen (**Bild 6 E-F**) konnte nicht beobachtet werden.

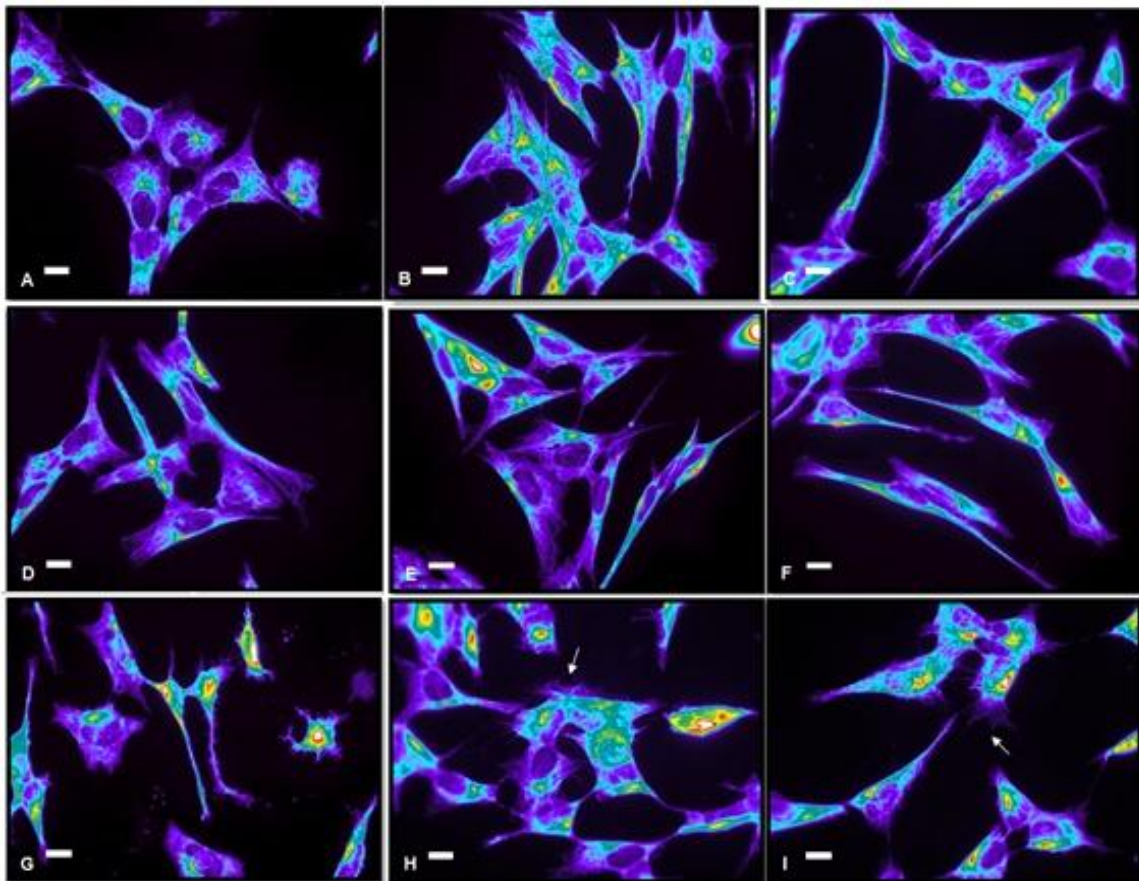


Bild 6: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. **(A)** 24,5h 0,1% EtOH; **(B)** 30 min 0,1% EtOH; **(C)** 30 min 30 μ M Testosteron; **(D)** 30 min 30 μ M 5 α -Dihydrotestosteron; **(E)** 30 min 30 μ M Androstendion; **(F)** 30 min 30 μ M Estron; **(G)** 30 min 30 μ M 17 β -Estradiol; **(H)** 24h 10 μ M Finasterid + 30 min 0,1% EtOH; **(I)** 24h 10 μ M Finasterid + 30 min 30 μ M Testosteron. Pfeile in **(H)** und **(I)** zeigen auf trigonale Zellformen mit Estradiol-spezifischen Filopodien. Balken: 10 μ m

3.1.3 Inhibierung der Hydroxysteroid-Sulfotransferase (ST2A3) durch S-(-)-1-Naphthyl-1-Ethanol in SH-SY5Y Neuroblastomazellen

Hydroxysteroid-Dehydrogenasen katalysieren die Sulfatierung von verschiedenen endogenen Steroiden. Die Sulfat-Konjugation spielt eine wichtige Rolle bei der Biotransformation von endogenen und exogenen Komponenten. Die involvierten Reaktionen führen zu einem Transfer einer Sulfuryl-Gruppe von 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat zu einer Hydroxyl- oder Amino-funktionalen Gruppe an einem Akzeptormolekül. Die Produkte sind Adenosin 3',5'-Diphosphat und ein Sulfonsäureester. Die Substrat-Stereoselektivität der Sulfotransferasen stellt bei der Auswahl eines kompetenten Inhibitors einen kritischen Punkt dar. Um die Sulfation von DHEA zu inhibieren, wurden verschiedene Enantiomere von 1-Naphthyl-1-Ethanol und 2-Naphthyl-1-Ethanol untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur S-(-)-1-Naphthyl-1-Ethanol mit ST2A3 interagiert und somit nur dieses Enantiomer als ein kompetenter Inhibitor der Sulfotransferase agiert (Duffel, 2003). In den vorangehenden Studien meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass eine Behandlung mit DHEA zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der SH-

SH-SY5Y Neuroblastomazellen führt. Diese Effekte werden zusätzlich vom Differenzierungsstatus der Zellen beeinflusst. Undifferenzierte SH-SY5Y Neuroblastomazellen bilden unter dem Einfluss von DHEA meist polygonale Zellformen mit Filopodien, die sich über die gesamte Zelloberfläche erstrecken. Mit steigender Differenzierung treten meist trigonale Zellformen auf, die ebenfalls die für DHEA charakteristischen Filopodien zeigen. DHEA kann reversibel in seinen Folgemetabolit DHEA-S umgewandelt werden. Mit DHEA-S behandelte SH-SY5Y-Zellen zeigen im undifferenzierten Zustand DHEA-ähnliche Strukturen. Die Zellformen sind rund bis polygonal und Filopodien oder Lamellipodien erstrecken sich über die gesamte Zelloberfläche. Bei mittel- und hochdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen sind die Merkmale nach der DHEA-S-Behandlung zu denen der DHEA-Behandlung dagegen unterschiedlich. Um die Effekte von DHEA auf das Cytoskelett eindeutig zu bestimmen und diesem Steroid zuordnen zu können, wurden die Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien vor der Inkubation mit DHEA mit dem ST2A3-Inhibitor S-(-)-1-Naphthyl-1-Ethanol behandelt.

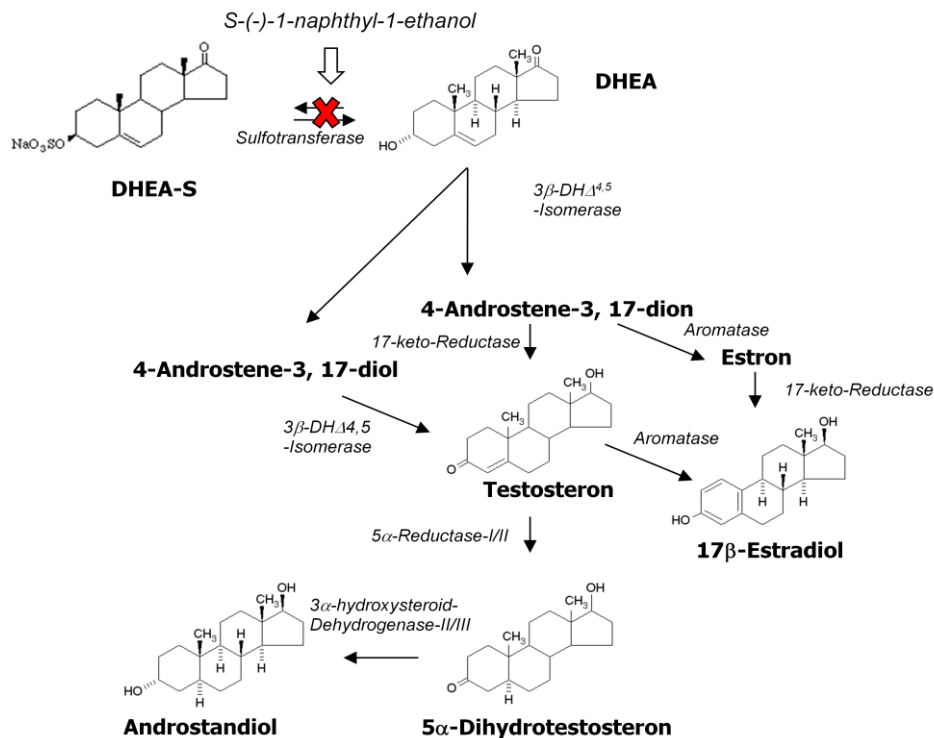


Abbildung 31: Darstellung der Folgemetaboliten von DHEA und der beteiligten Enzym-Systeme. S-(-)-1-naphthyl-1-ethanol inhibiert selektiv die reversible Metabolisierung von DHEA zu DHEA-S durch die Sulfotransferase (ST2A3).

Die Untersuchungen der SH-SY5Y-Zellen mit dem Sulfotransferase-Inhibitor S-(-)-1-naphthyl-1-ethanol wurden in verschiedenen Differenzierungsstadien durchgeführt. Neben den Kontrollen mit 0,1% EtOH und 0,1% DMSO wurden auch die möglichen Folgemetaboliten von DHEA als Kontrollen herangezogen. Die charakteristischen morphologischen Merkmale dieser Steroide sind, abhängig vom Differenzierungsgrad, in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3

Steroid	Charakteristische morphologische Merkmale der Kontrollsteroidoide im jeweiligen Differenzierungsstatus			
	undifferenziert (UD)	andifferenziert (AD)	mitteldifferenziert (MD)	hochdifferenziert (HD)
0,1% EtOH 30 min	Zellform: trapezoid/dreieckig	Zellform: trapezoid/dreieckig	Zellform: trapezoid/selten langgestreckt	Zellform: trapezoid/langgestreckt
0,1% EtOH 24,5 h	Zellform: trapezoid/dreieckig	Zellform: trapezoid/dreieckig	Zellform: trapezoid/selten langgestreckt	Zellform: trapezoid/langgestreckt
0,1% DMSO	Zellform: trigonal/selten langgestreckt	wie UD	Zellform: polygonal/lang; Zellen vernetzt	wie UD
30 μ M DHEA 30 min	Zellform: trigonal/polygonal; Filopodien über ges. Oberfläche	Zellform: wie UD Zellkörper kleiner und stärkere Vernetzung	Zellform: wie AD längere Filopodien	Zellform: polygonal/langgestreckt; Filopodien + Lamellipodien
30 μ M Testosteron 30 min	Zellform: lang Neuriten (asymmetrisch); Wachstumskegel mit Lamellipodien	Zellform: wie UD vermehrt Zell-Zell- Kontakte; vereinzelt Filopodien	Zellform: sehr lang lange Neuriten , vermehrt Zell-Zell- Kontakte; auch trigonale Formen mit Filopodien	Zellform: wie MD 5α-DHT- und 17β- Estradiol-Merkmale
30 μ M 5 α - DHT 30 min	Zellform: polygonal kürzere Neuriten , Wachstumskegel stark vergrößert und transparent erscheinend	wie UD	wie UD	Zellform: langgestreckt wie UD
30 μ M 17 β - Estradiol 30 min	Zellform: trigonal/abgerundet lange, abgerundete Filopodien , Verteilung über ges. Oberfläche	wie UD	Zellform: selten langgestreckt wie UD	wie MD Zellenden breit
30 μ M DHEA-S 30 min	Zellform: polygonal an einem Ende breiter Ausläufer; Lamellipodien	Zellform: versch. Zellformen; stark ausgeprägte Lamellipodien , senkrecht gespalten	wie AD, Lamellipodien extrem ausgeprägt	wie MD

Die neuronalen Zellen wurden entsprechend den in 2.4.2.2.1 angegebenen Differenzierungsprotokollen differenziert und dann entsprechend in Serum-freiem Medium mit den Steroiden, S-(-)-1-naphthyl-1-ethanol oder in Kombination mit diesem behandelt. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Mikrotubuli.

DHEA induziert in undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen die für DHEA typischen polygonalen bis trigonalen Zellformen mit Filopodien, die sich über die gesamte Zelloberfläche erstrecken (**Bild 7 D**). Mit DHEA-S behandelte SH-SY5Y-Zellen zeigen ebenfalls polygonale bis trigonale Zellformen, jedoch kann man an einem Zellende meist einen etwas längeren und breiteren Zellausläufer beobachten. Die sich bildenden Lamellipodien weisen einen eher transparenten, häutigen Charakter auf (**Bild 7 G**).

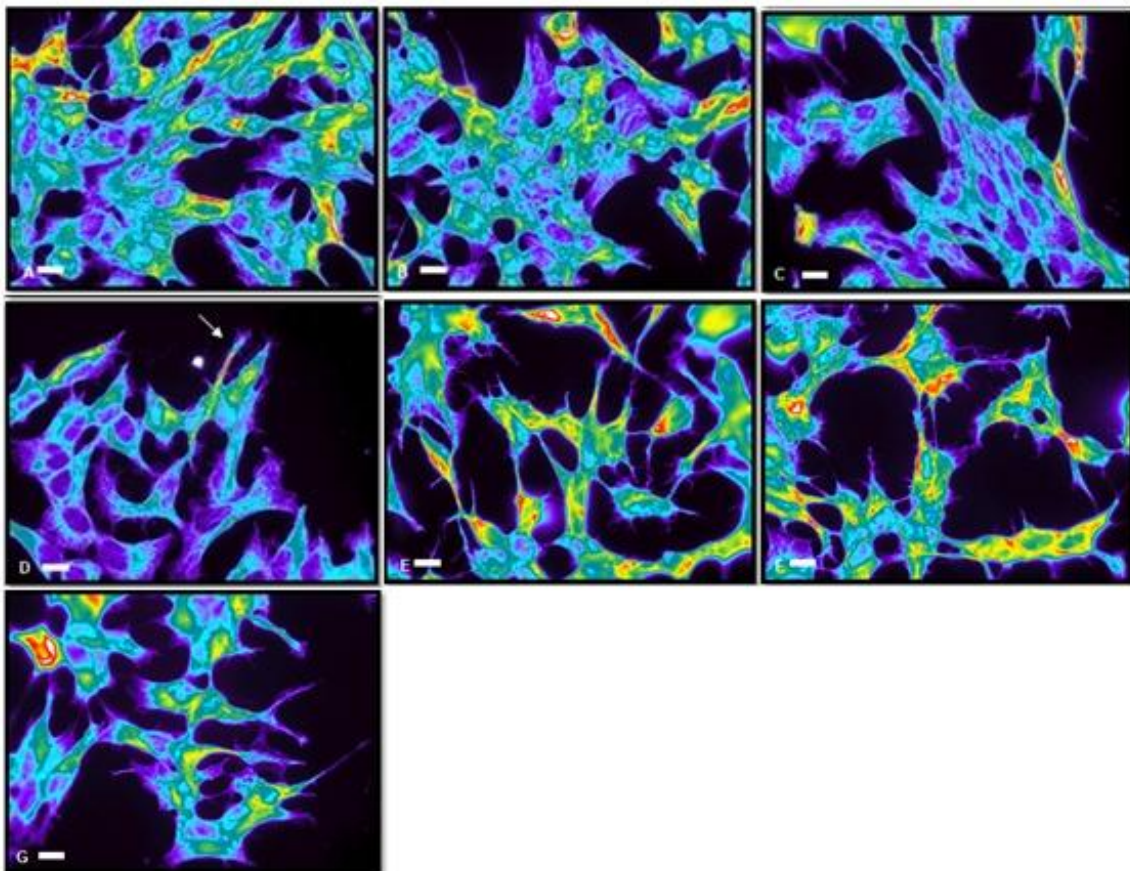


Bild 7: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen, 40. **(A)** 30 min 0,1% EtOH; **(B)** 24,5h 0,1%EtOH; **(C)** 30 min 0,1% DMSO; **(D)** 30 min DHEA 30 μ M, Pfeil zeigt auf die Filopodien; **(E)** 24h Naphthylethanol + 30 min 0,1% EtOH; **(F)** 24h Naphthylethanol + 30 min DHEA 30 μ M; **(G)** 30 min DHEA-S 30 μ M. Balken: 10 μ m

Nach der Inkubation mit Naphthylethanol zeigen die Zellen ebenfalls charakteristische Merkmale von DHEA. Auch hier bilden sich die typischen Zellformen mit Filopodien, die sich über die gesamte Zelloberfläche erstrecken. Verstärkt treten diese Merkmale in Kombination mit DHEA auf. Die Filopodien sind nach dieser Behandlung noch stärker ausgeprägt als bei der alleinigen Behandlung der Zellen mit DHEA.

DHEA induziert in andifferenzierten SH-SY5Y-Zellen die für DHEA typischen polygonalen bis trigonalen Zellformen mit Filopodien, die sich über die gesamte Zelloberfläche

erstrecken. Die Zellkörper sind in diesem Stadium verkleinert und die Zellen untereinander stärker vernetzt (**Bild 8 K**).

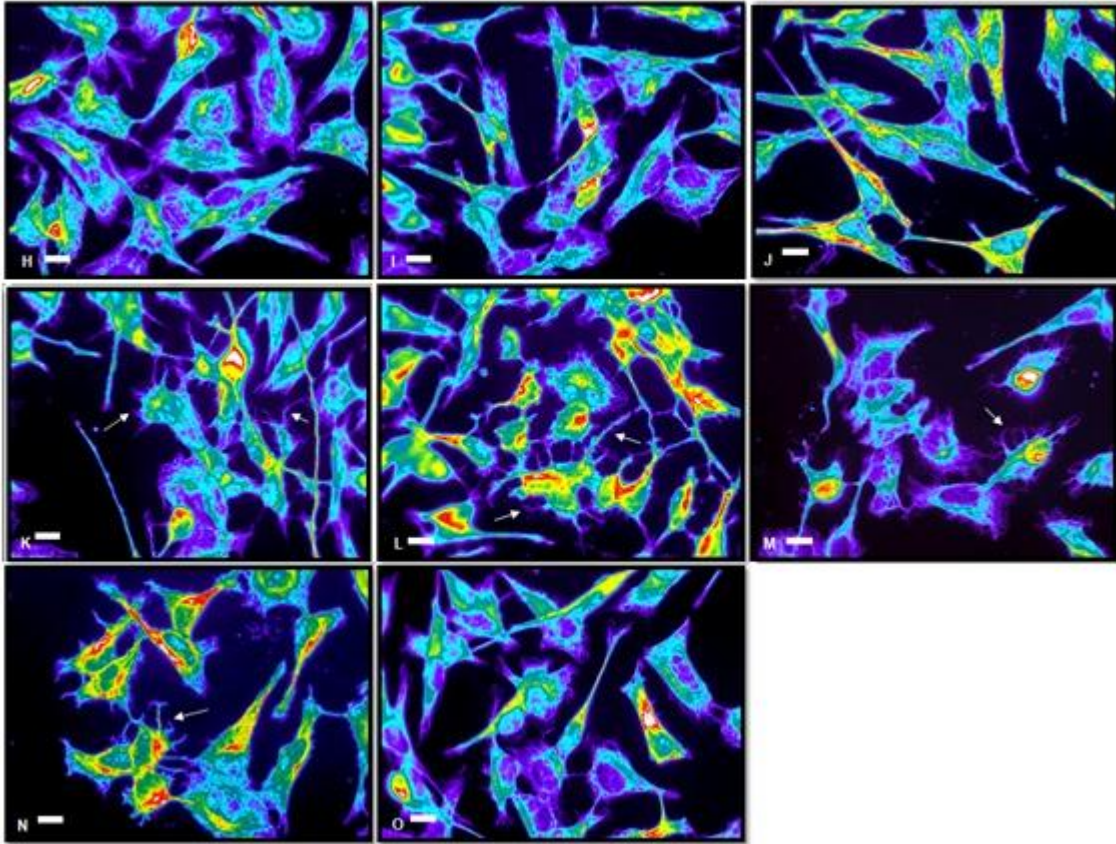


Bild 8: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. **(H)** 30 min 0,1% EtOH; **(I)** 24,5h 0,1%EtOH; **(J)** 30 min 0,1% DMSO; **(K)** 30 min DHEA 30 μ M, Pfeile zeigen auf die Filopodien; **(L)** 24h Naphthylethanol + 30 min 0,1% EtOH **(M)+(N)** 24h Naphthylethanol + 30 min DHEA 30 μ M, Pfeile in **(M)** und **(N)** zeigen auf sehr lange Filopodien; **(O)** 30 min DHEA-S 30 μ M. Balken: 10 μ m

Die Behandlung mit DHEA-S führt in diesem Stadium zu verschiedenen Zellformen und zur Bildung von Lamellipodien. Die Zelloberfläche ist meist glatt und die Zellausläufer zeigen extrem transparente Strukturen. An den langgestreckten Zellformen sind die Lamellipodien nur an einem Zellende lokalisiert und meist senkrecht gespalten und erinnern an die Form einer Fischeschwanzflosse (**Bild 8 O**).

Zellen, die mit Naphthylethanol behandelt wurden, bilden typische DHEA-Merkmale aus, da sich auch hier viele Filopodien beobachten lassen (**Bild 8 L**). Verstärkt werden diese Formen in Kombination mit DHEA, es bilden sich extrem lange Filopodien, die in sich nochmals verzweigt sind (**Bild 8 M-N**).

Mitteldifferenzierte SH-SY5Y-Zellen, die mit DHEA behandelt wurden, bilden die für DHEA typischen polygonalen bis trigonalen Zellformen mit Filopodien, die sich über die gesamte Zelloberfläche erstrecken. Die Zellkörper sind in diesem Stadium verkleinert und die Zellen untereinander stärker vernetzt. Die Filopodien sind deutlich länger als im undifferenzierten Stadium (**Bild 9 S**). In diesem Differenzierungsstadium sind SH-SY5Y-Zellen, die mit Naphthylethanol und dann für 30 Minuten mit 0,1% Ethanol oder 30 μ M DHEA behandelt wurden, nicht zu unterscheiden. Beide Behandlungen induzieren das Auswachsen von

Neuriten, die stark untereinander vernetzt sind. An den Neuriten bilden sich vielfach Filopodien aus und die Zellkörper sind stark verkleinert (**Bild 10 T-V**). Die mit DHEA-S behandelten Zellen zeigen unspezifische Zellformen mit meist stark ausgeprägten Lamellipodien (**Bild 10 W**).

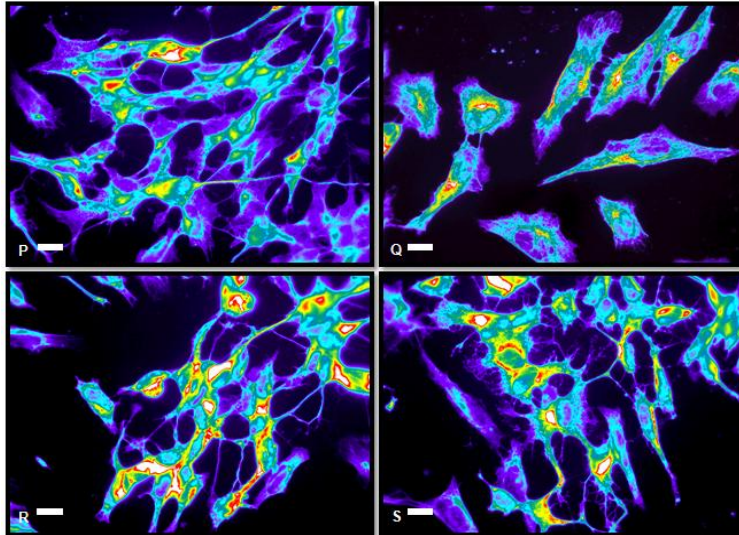


Bild 9: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. **(P)** 30 min 0,1% EtOH; **(Q)** 24,5h 0,1%EtOH; **(R)** 30 min 0,1% DMSO; **(S)** 30 min DHEA 30 μ M. Balken: 10 μ m

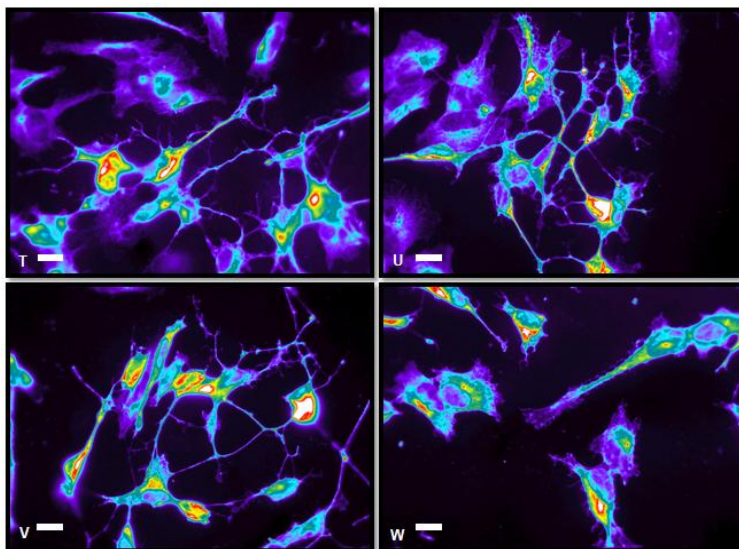


Bild 10: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. **(T)** 24 h Naphthylethanol + 0,1% EtOH 30 min; **(U)+(V)** 24 h Naphthylethanol + 30 min DHEA 30 μ M; **(W)** 30 min DHEA-S 30 μ M. Balken: 10 μ m.

DHEA induziert im hochdifferenzierten Stadium meist polygonale oder langgestreckte Zellformen mit Filopodien und Lamellipodien. Die Filopodien sind besonders an den langgestreckten Zellformen ausgeprägt, die Lamellipodien bilden sich meist an den polygonalen Zellformen (**Bild 11 D**). Naphthylethanol induziert in ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen keine DHEA-spezifischen Merkmale. Die Zellen sind langgestreckt und bilden Neuriten mit gut erkennbaren Wachstumskegeln (**Bild 11 E-F**).

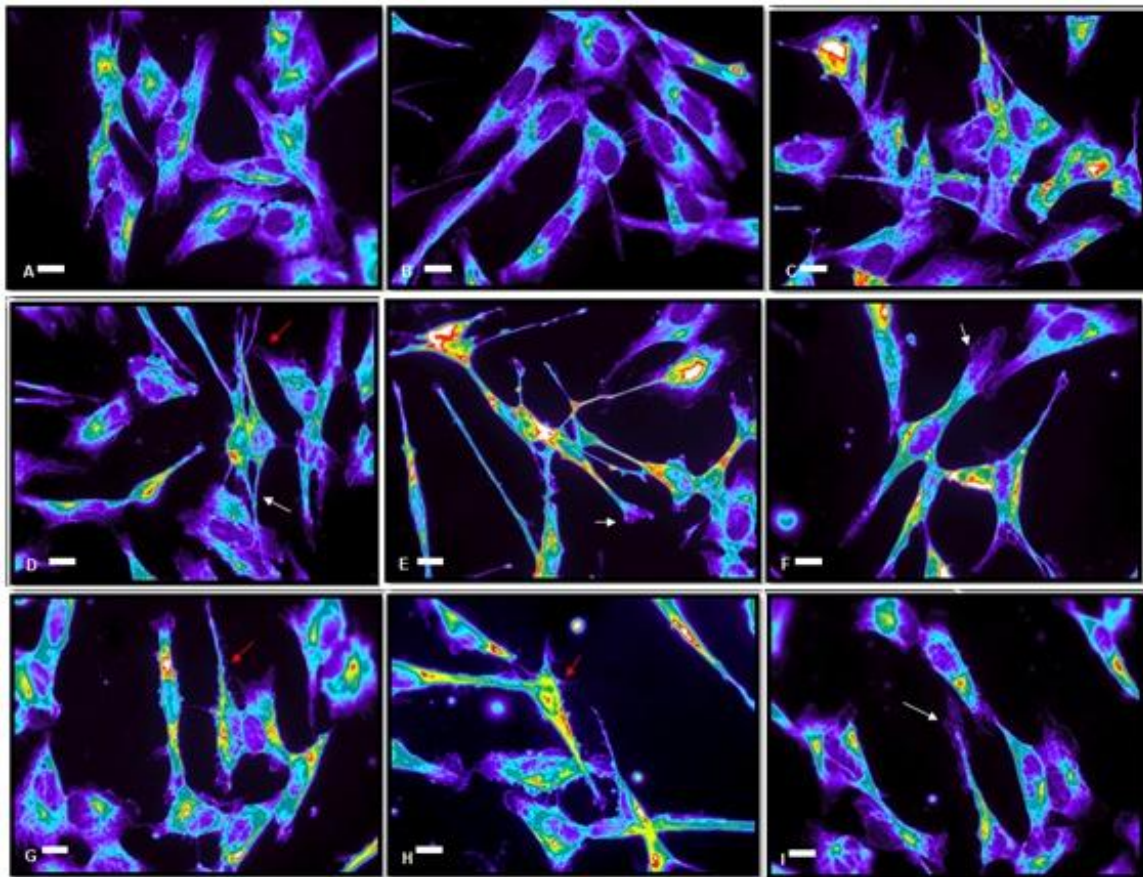


Bild 11: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. (A) 30 min 0,1% EtOH; (B) 24,5h 0,1%EtOH; (C) 30 min 0,1% DMSO; (D) 30 min DHEA 30 μ M. Weißer Pfeil in (D) zeigt auf Filopodien an den langgestreckten Zellformen, roter Pfeil in (D) zeigt auf Lamellipodien an polygonalen Zellformen; (E)+(F) 24 h Naphthylethanol + 0,1% EtOH 30 min; (G)+(H) 24 h Naphthylethanol + 30 min DHEA 30 μ M; (I) 30 min DHEA-S 30 μ M. Pfeil in (E) zeigt auf Neuriten mit Wachstumskegeln. Pfeil in (F) zeigt auf verbreiterten Wachstumskegel mit 5 α -DHT-spezifischen Merkmalen. Rote Pfeile in (G)+(H) zeigen auf langgestreckte Zellformen mit langen Estradiol-spezifischen Filopodien. Pfeil in (I) zeigt auf Lamellipodien. Balken: 10 μ m

Diese Zellformen sind normalerweise bei der Behandlung der Zellen mit Testosteron zu beobachten. Des Weiteren kommen auch sehr häufig 5 α -Dihydrotestosteron-spezifische Merkmale vor. Dabei verbreitert sich der Bereich des Wachstumskegels sehr stark und es bilden sich großflächige, transparente Strukturen. Die Kombination von Naphthylethanol und DHEA führt dagegen zur Ausbildung von meist langgestreckten Zellformen mit Estradiol-spezifischen Merkmalen. Es bilden sich lange Filopodien, die sich über die gesamte Zelloberfläche erstrecken (**Bild 11 G-H**). Lamellipodien bilden sich auch nach der Behandlung der Zellen mit DHEA-S (**Bild 11 I**). Diese Strukturen sind in diesem Differenzierungsstadium auch bei Zellen zu beobachten, die nur mit DHEA 30 μ M behandelt wurden.

Zusammenfassung: DHEA induziert in SH-SY5Y-Zellen das Auswachsen von Filopodien, die über die gesamte Zelloberfläche verteilt sind. Die Morphologie dieser Filopodien ist den durch Estradiol induzierten Filopodien recht ähnlich. In höher differenzierten Stadien kommt es aber nach Behandlung der Zellen mit DHEA zur Bildung von DHEA-S spezifischen Merkmalen in Form von Lamellipodien. Um die Metabolisierung von DHEA in DHEA-S durch die Sulfotransferase zu inhibieren, wurden die Zellen vor der

Inkubation mit DHEA mit Naphthylethanol behandelt. Die alleinige Behandlung der Zellen mit Naphthylethanol ohne Zusatz von DHEA führt zur Ausbildung von Testosteron-spezifischen Merkmalen, da es zum Auswachsen von Neuriten kommt. Die Kombination von Naphthylethanol und DHEA führt dann zur Bildung von Estradiol-spezifischen Merkmalen in Form langer Filopodien. Diese Ergebnisse zeigen, dass die morphologischen Effekte eindeutig DHEA zugewiesen werden können, da es nach Einsatz des Inhibitors zu keiner Ausbildung DHEA-S spezifischer Merkmale kommt. Durch die Inhibierung der Sulfotransferase kommt es jedoch zur Ausbildung von Merkmalen, die den Folgemetaboliten Testosteron und 17β -Estradiol zugewiesen werden können.

3.2 Untersuchung des Metabolismus von Formestan mittels Dünnschichtchromatographie

Die morphologischen Untersuchungen der mit dem P450 Aromatase-Inhibitor Formestan behandelten Zellen haben ergeben, dass in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums Steroid-spezifische Merkmale auftreten, die den Steroiden 5α -Dihydrotestosteron und Androstandiol zugeordnet werden können. Ziel der folgenden Versuche war es zum Einen, die Bildung dieser Steroide nachzuweisen und zum Anderen zu untersuchen, ob diese endogen gebildet werden oder ob der zugesetzte Inhibitor Formestan seinerseits metabolisiert wird. Um die oben genannten Steroide detektieren zu können, wurde als Nachweisverfahren eine modifizierte Dünnschichtchromatographie gewählt (Godin, 1999). Mit der hier verwendeten Methode ist es möglich, Steroide noch im Nanogramm-Bereich nachzuweisen. Die optische Nachweisgrenze liegt bei ca. 80 ng. Auf eine Quantifizierung wurde in den folgenden Abschnitten verzichtet. Zunächst wurde das Laufverhalten verschiedener C_{19} -Steroide untersucht und die R_f -Werte der einzelnen Steroide ermittelt. Der R_f -Wert errechnet sich dabei aus der Laufstrecke der Substanz/Laufstrecke der Laufmittelfront.

Für die getesteten Steroide wurden folgende R_f -Werte ermittelt:

<i>Steroid</i>	<i>R_f-Wert</i>
17β-Estradiol	0,26 \pm 0,02
5α-Dihydrotestosteron	0,40 \pm 0,02
Androstandiol	0,23 \pm 0,02
Androstendiol	0,19 \pm 0,02
Androstendion	0,49 \pm 0,02
Cholesterin	0,50 \pm 0,02
DHEA	0,34 \pm 0,02
Estron	0,49 \pm 0,02
Testosteron	0,29 \pm 0,02

Die Untersuchung der Lipidextrakte aus SH-SY5Y mittels DC ergab, dass alle Steroide, einschließlich Cholesterin, ein anderes Laufverhalten besitzen, als ihre Referenzen. Zusätzlich konnte man erkennen, dass die Laufstrecke aller Steroide mit steigender, aufgetragener Lipidmenge abnimmt. Diese Beobachtung konnte sowohl für Lipidextrakte von Zellen als auch für Lipidextrakte aus Überständen gemacht werden. Um die Steroidspots eindeutig zuweisen zu können, wurden die Spots ausgekratzt, eluiert und das Molekulargewicht per Massenspektrometrie bestimmt. Danach wurde das Laufverhalten von endogenem Cholesterin, exogenem Testosteron und DHEA nach der Lipidextraktion aus Zellextrakten und Zellüberständen überprüft. Dafür wurden nach den Steroidbehandlungen Lipidextrakte aus den Zellen und Lipidextrakte aus dem Zellüberstand plus Waschfraktion angefertigt und getrennt auf die DCs aufgetragen. Aus der chromatographischen Auftrennung der einzelnen Lipidextrakte ging hervor, dass die Hauptmenge des exogen zugesetzten Steroids im Zellüberstand zu finden ist und nicht im Zellextrakt. Aus diesem Grund wurden für die Versuche zur Metabolisierung von Formestan Gesamtlipid-Extraktionen aus Zelllysaten und Zellüberständen verwendet.

Auf Spur 3 von DC A (**Bild 12**) wurde das Lipidextrakt von undifferenzierten und unbehandelten SH-SY5Y aufgetragen. In der Mitte der DC ist deutlich der Cholesterin-Spot zu erkennen und in der Nähe der Lauffront der Spot der Cholesterin-Ester. Auch hier läuft das Cholesterin aus dem Lipidextrakt nicht so weit wie die Referenz. Bei der Kontrolle sind keine zusätzlichen Steroid-Spots zu detektieren. Auf Spur 5 von DC B (**Bild 12**) wurde das Lipidextrakt von 3 konfluenten Schalen undifferenzierter SH-SY5Y aufgetragen, die 24 h mit Formestan behandelt wurden. Hier sind eindeutig drei Spots in der Mitte der DC zu erkennen. Bei dem obersten Spot handelt es sich um das Formestan aus der Probe, bei dem mittleren Spot handelt es sich um Cholesterin und beim unteren Spot um ein weiteres, nach der Behandlung mit Formestan neu entstandenes Steroid. Für die Massenspektroskopische Bestimmung wurde die untere Bande aus der DC ausgekratzt und eluiert. Die Massenspektrometrie detektierte ein Steroid mit der Masse von 290,6. Dieses Gewicht entspricht exakt der Masse von Dihydrotestosteron. Ob es sich dabei um 5 α -DHT oder 5 β -DHT handelt, lässt sich durch die massenspektroskopische Analyse nicht feststellen.

Auf Spur 3 von DC C (**Bild 12**) wurde der Lipidextrakt von 4 konfluenten Schalen undifferenzierter SH-SY5Y aufgetragen und die Steroide mit dem Sprühreagenz H₂SO₄/MeOH entwickelt. Bei dieser Methode ist gut zu erkennen, dass jedes Steroid eine charakteristische und unterschiedliche Färbung aufweist. Diese Methode ist jedoch nicht so sensitiv wie die Trennung der Steroide über Silbernitrat beschichtete DC-Platten. Dennoch sind in Spur 3 vier Spots mit jeweils unterschiedlicher Färbung zu erkennen. Bei dem oberen blauen Spot handelt es sich um Formestan, bei dem darunter liegenden rosa Spot handelt es sich um Cholesterin. Der dritte Spot zeigt eine lila Färbung und liegt auf der Höhe des Spots von 5 α -Dihydrotestosteron (siehe DC C Pfeil). Der R_f-Wert dieses Spots beträgt 0,375. Ebenfalls ist gut zu erkennen, dass auch der Dihydrotestosteron-Spot lila gefärbt ist.

Nach der Auswertung des Laufverhaltens und der R_F -Werte aller durchgeführten Dünnschichtchromatographien und der massenspektrometrischen Bestimmungen der Steroid-Spots aus den Lipidextrakten von undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen, muss es sich bei diesem neu entstandenen Steroid um 5α -Dihydrotestosteron handeln. Der untere vierte auftretende Spot zeigt eine gelbe Färbung, wie sie auch bei der Androstandiol-Referenz auftritt. Dieser Spot wurde jedoch nicht massenspektrometrisch vermessen.

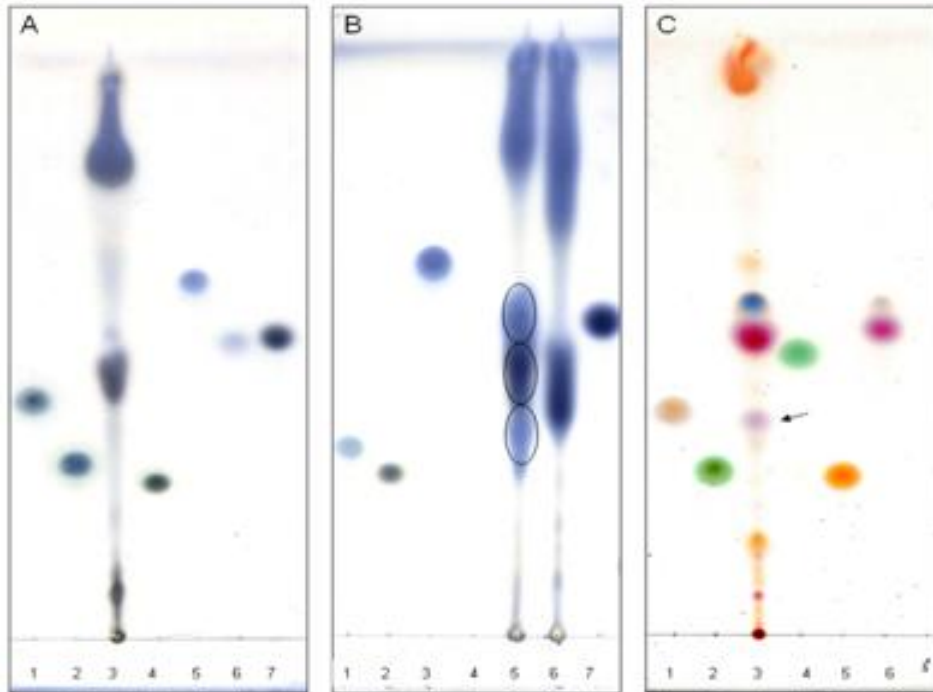


Bild 12: Chromatographische Auftrennung von C_{19} -Steroiden; Laufmittel: Toluol:Aceton:Chloroform (8:2:5);
Sprühreagenz für A und B: Ammoniummolybdat/ H_2SO_4 ; Sprühreagenz für C: H_2SO_4 /MeOH
Für die Referenzen wurden jeweils $8\ \mu\text{g}$ Steroid aufgetragen.

<p>A</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 5α-DHT 2) 17β-Estradiol 3) Lipidextrakt Kontrolle 4) 17β-Estradiol 5) 5α-DHT 6) Androstendion 7) Cholesterin 	<p>B</p> <ol style="list-style-type: none"> Testosteron 17β-Estradiol Formestan Finasterid Lipidextrakt Formestan Lipidextrakt Finasterid Cholesterin 	<p>C</p> <ol style="list-style-type: none"> 5α-DHT Testosteron Lipidextrakt Formestan Androstendion Androstandiol Cholesterin -----
--	---	--

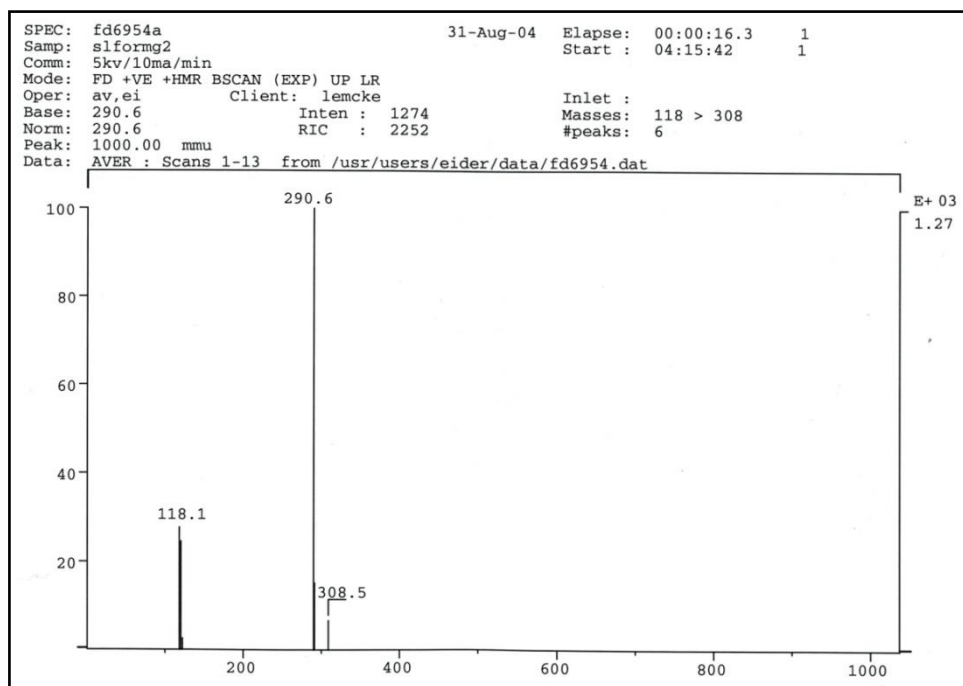


Bild 13: Massenspektroskopische Analyse des neu entstandenen Steroids nach der Eluation der Bande aus dem Kieselgel. Es wurde ein Steroid mit der Masse von 290,6 detektiert, diese Masse entspricht exakt der Masse von Dihydrotestosteron.

In weiteren Versuchen wurden die Lipidextrakte von undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen untersucht, die 24 h bzw. 72 h mit Formestan und 30 Minuten Testosteron $30 \mu\text{M}$ behandelt wurden. In diesen Versuchen wurden Lipidextrakte vom Überstand der Formestan-Behandlung, vom Überstand der Testosteron-Behandlung und ein Lipidextrakt der Zellen untersucht. Mit dieser Methode sollte festgestellt werden, in welcher Phase sich das Formestan und das entstandene 5α -Dihydrotestosteron befinden. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl Formestan als auch das entstandene 5α -Dihydrotestosteron nach 24h hauptsächlich im Überstand der Zellen vorkommen. Wurden die Zellen 72h mit Formestan behandelt, konnte das Formestan und das neu entstandene 5α -Dihydrotestosteron nicht mehr im Überstand detektiert werden. Beide Steroide befanden sich nach 72 h im Lipidextrakt der Zellen. Auch in diesem Fall wurde das neu entstandene Steroid aus der DC ausgekratzt und per Massenspektrometrie bestimmt. Dabei wurde wieder eine Masse von 290,6 detektiert.

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem nach der Formestan-Behandlung neu entstandenen Steroid 5α -Dihydrotestosteron um endogen metabolisiertes 5α -Dihydrotestosteron handelt, wurden die Zellen vor der Zugabe von Formestan 24 Stunden mit Aminogluthetimid ($100 \mu\text{M}$) behandelt. Aminogluthetimid blockt alle P450 enzymatischen Reaktionen, d.h. es kommt auch zur Inhibierung der 11β -Hydroxylase, der Aldosteron-Synthase, der Thyroxin-Synthase und aller Enzyme, die in die Synthese der Glucokortikoide involviert sind (Santen, 1999). Somit kann dann das Auftreten von endogen metabolisiertem Dihydrotestosteron ausgeschlossen werden.

Als Kontrolle wurden zunächst die Lipidextrakte von undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen auf die DC aufgetragen, die 24 h nur mit Aminogluthetimid behandelt wurden. In DC A (**Bild 14**) auf Spur 3 wurde der Lipidextrakt der mit Aminogluthetimid behandelten Zellen aufgetragen.

Es ist ganz deutlich zu erkennen, dass zwischen der Startfront und dem Cholesterin-Spot keinerlei Steroid-Spots, die sich bei unbehandelten Kontrollen als „Schmier“ darstellen, auftauchen. Man kann davon ausgehen, dass die Steroidbiosynthese der Zellen inhibiert wurde. Dann wurden die Lipidextrakte von Zellen untersucht, die 24h mit Aminogluthetimid (100 µM) und 24 h mit Formestan (10 µM) behandelt wurden (**Bild 14 DC B**). Es ist deutlich zu erkennen, dass trotz der Inhibierung durch Aminogluthetimid die drei typischen Spots nach der Behandlung mit Formestan wieder auftreten. Dies zeigt, dass es sich bei dem entstandenen Dihydrotestosteron nicht um endogen synthetisiertes DHT handelt, sondern DHT aus dem zugesetzten Formestan metabolisiert wird. Die gleichen Ergebnisse konnten mit den Lipid-Extrakten von mittel- und ausdifferenzierten Zellen erzielt werden (**Bild 14 DC C+B**).

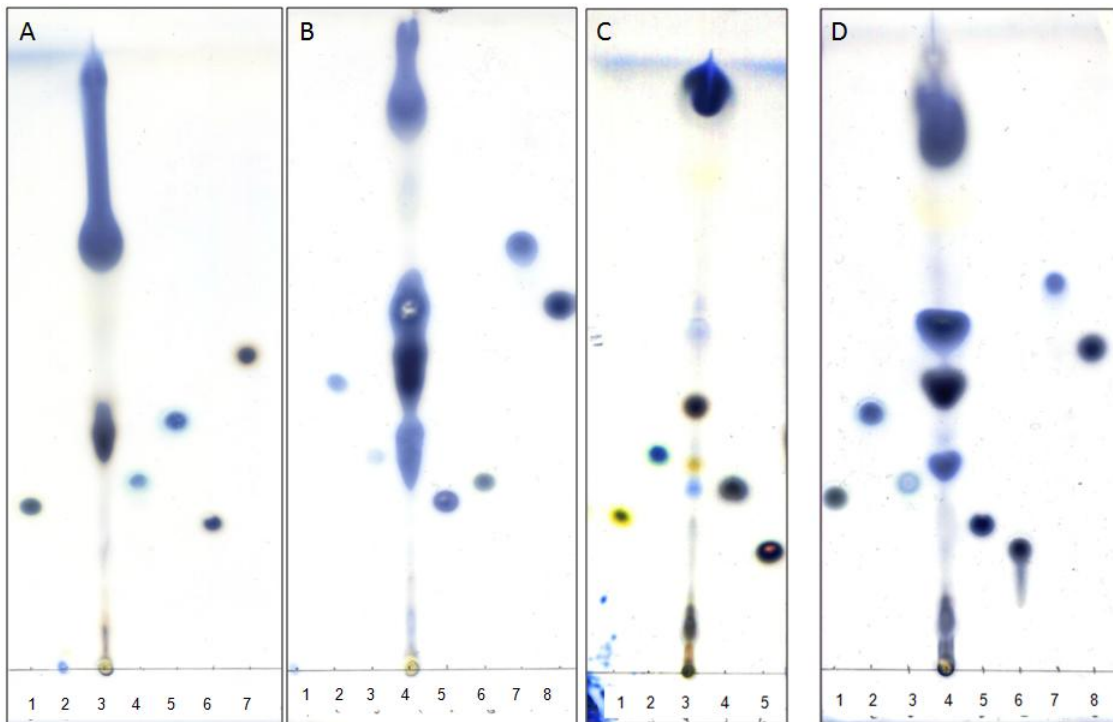


Bild 14: Chromatographische Auftrennung von C₁₉-Steroiden; Laufmittel: Toluol:Aceton:Chloroform (8:2:5);
 Sprühreagenz für A und B: Ammoniummolybdat/H₂SO₄; Sprühreagenz für C: H₂SO₄/MeOH
 Für die Referenzen wurden jeweils 8 µg Steroid aufgetragen.

(A) Lipidextrakt von undifferenzierten Zellen, die 24h mit Aminogluthetimid (100 µM) behandelt wurden; (B) Lipidextrakt von undifferenzierten Zellen nach Behandlung mit 24h Aminogluthetimid (100 µM) + 24h Formestan (10 µM); (C) Lipidextrakt von ausdifferenzierten Zellen nach Behandlung mit 24h Aminogluthetimid (100 µM) + 24h Formestan (10 µM); (D) Lipidextrakt von mitteldifferenzierten Zellen nach Behandlung mit 24h Aminogluthetimid (100 µM) + 24h Formestan (10 µM)

A	B	C	D
1) 17β-Estradiol	Aminogluthetimid	17β-Estradiol	17β-Estradiol
2) Aminogluthetimid	5α-DHT	5α-DHT	5α-DHT
3) Lipidextrakt	Testosteron	Lipidextrakt Formestan	Testosteron
4) Testosteron	Lipidextrakt Formestan	DHEA	Lipidextrakt Formestan
5) 5α-DHT	17β-Estradiol	Androstandiol	Androstandiol
6) Androstandiol	Androstandiol	-----	Formestan
7) Cholesterin	Formestan	-----	Cholesterin
8) -----	Cholesterin		

3.3 Ermittlung der geeigneten Konzentrationen von DHEA und Testosteron im physiologischen Bereich

Die in den vorherigen Versuchen eingesetzten Steroidkonzentrationen von DHEA und Testosteron lagen im mikromolaren Bereich. Die Steroidkonzentrationen liegen im Allgemeinen im Blutplasma oder nicht-steroidogenen Geweben im nanomolaren Bereich, in steroidogenen Geweben hingegen können sie im hohen μM Bereich liegen. Der Plasmaspiegel von DHEA liegt bei Frauen und Männern zwischen 5-10 μM (Rainey, 2004). Ziel der Versuche war es, eine Konzentration der Steroide im nanomolaren Bereich zu finden, die die charakteristischen morphologischen Veränderungen noch stark induziert. Dazu wurde eine Steroidkonzentrationsreihe für DHEA und Testosteron durchgeführt und anhand morphologischer Kriterien ausgewertet.

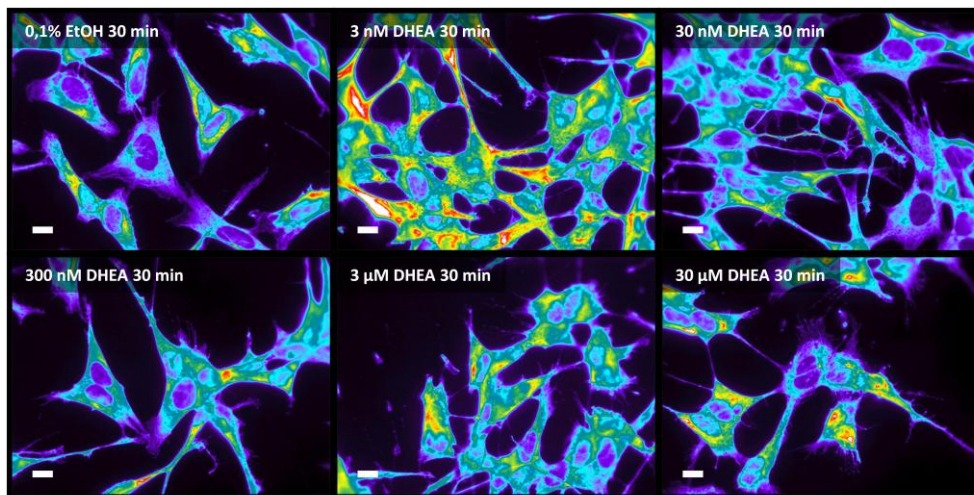


Bild 15: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen, 400x vergrößert. Zeigt die Konzentrationsreihe von DHEA. Balken: 10 μm

Mitteldifferenzierte SH-SY5Y wurden 30 Minuten mit DHEA im Konzentrationsbereich von 30 μM – 3 nM behandelt. Als positiv wurden diejenigen Zellen gezählt, die Filopodien gebildet hatten. Im mitteldifferenzierten Stadium zeigen mit DHEA behandelte Zellen eher langgestreckte Zellformen mit Filopodien, die sich meist über die gesamte Zelloberfläche erstrecken. Kontrollzellen zeigen polygonale bis trigonale Zellformen ohne spezifische Ausläufer. Bei der Inkubation der Zellen mit 30 μM DHEA zeigen 96% der Zellen diese Charakteristika. Bei der Behandlung mit 30 nM DHEA kommt es noch bei 66% der Zellen zu diesen morphologischen Veränderungen. Mit 3 nM DHEA behandelte Zellen weisen hingegen kaum Veränderungen zu Kontrollzellen auf. Die optimale physiologische Konzentration für DHEA wurde somit auf 30 nM festgelegt.

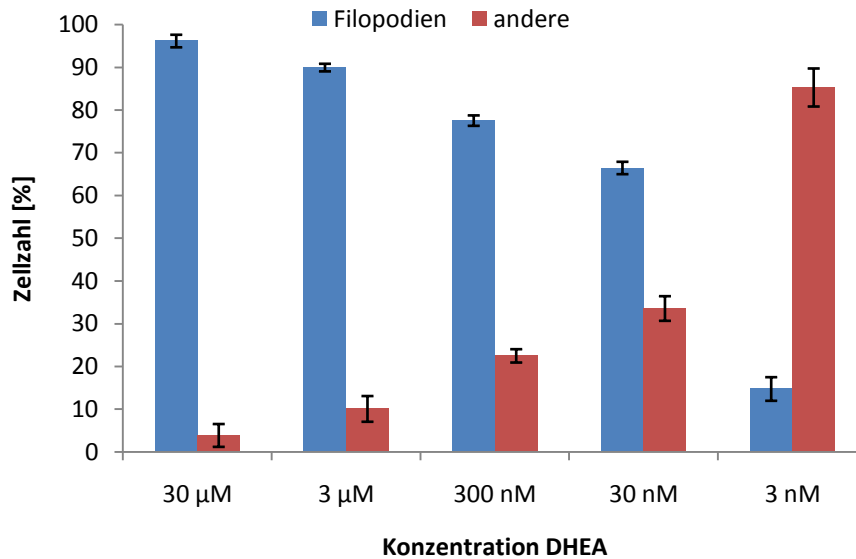


Diagramm 1: Konzentrationsreihe von DHEA im Konzentrationsbereich 30 µM-3 nM. Als Kriterien für die Wirksamkeit der eingesetzten DHEA-Konzentrationen wurde die Bildung von Filopodien herangezogen. Statistik aus 4 unabhängigen Versuchsdurchgängen; es wurden jeweils 5 Gesichtsfelder (400x) ausgezählt.

Für die Bestimmung der idealen Konzentration im nanomolaren Bereich für Testosteron wurden mitteldifferenzierte Zellen mit Testosteron im Konzentrationsbereich von 30 µM – 3 nM behandelt. Als positiv wurden diejenigen Zellen gewertet, die Neuriten mit gut ausgeprägten Wachstumskegeln bildeten und auch Merkmale von 17β-Estradiol in Form von Filopodien und 5α-Dihydrotestosteron-Merkmale aufwiesen. Bei der Behandlung der Zellen mit 30 µM Testosteron kommt es bei ca. 90% der Zellen zur Bildung von Neuriten mit gut erkennbaren Wachstumskegeln.

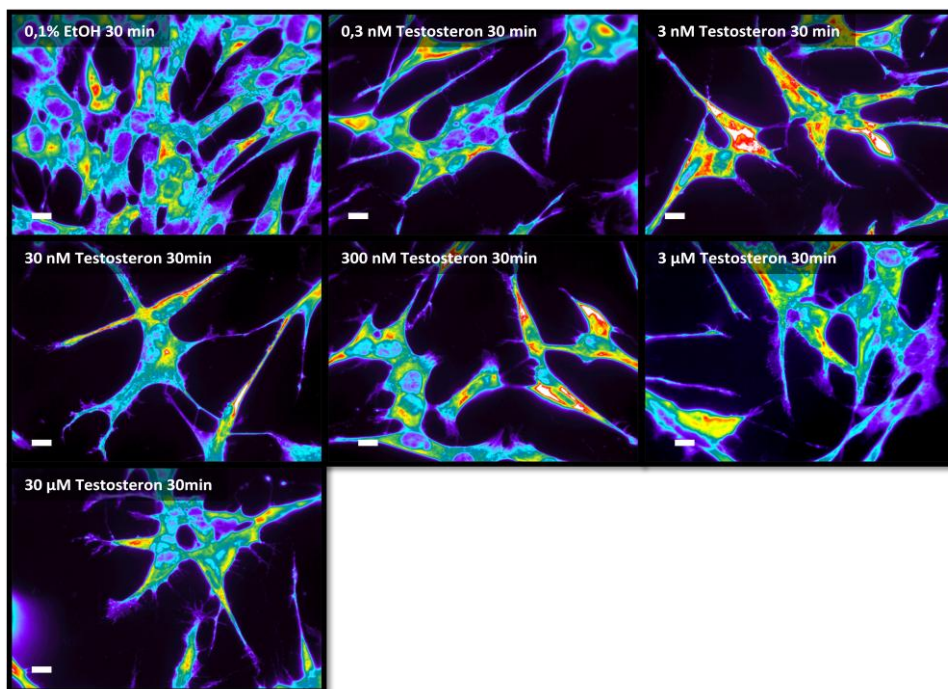


Bild 16: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen, 400x vergrößert. Zeigt die Konzentrationsreihe von Testosteron. Balken: 10 µm

Merkmale von 17β -Estradiol und 5α -Dihydrotestosteron kommen kaum vor. Mit sinkender Testosteron-Konzentration kommt es immer mehr zur Bildung von Estradiol- und DHT-spezifischen Merkmalen, die Ausbildung von langen Neuriten wird vermindert. In dem Konzentrationsbereich zwischen 30 nM und 3 nM Testosteron ergeben sich keine signifikanten morphologischen Unterschiede mehr. Die optimale physiologische Konzentration von Testosteron wurde daher auf 3 nM festgelegt.

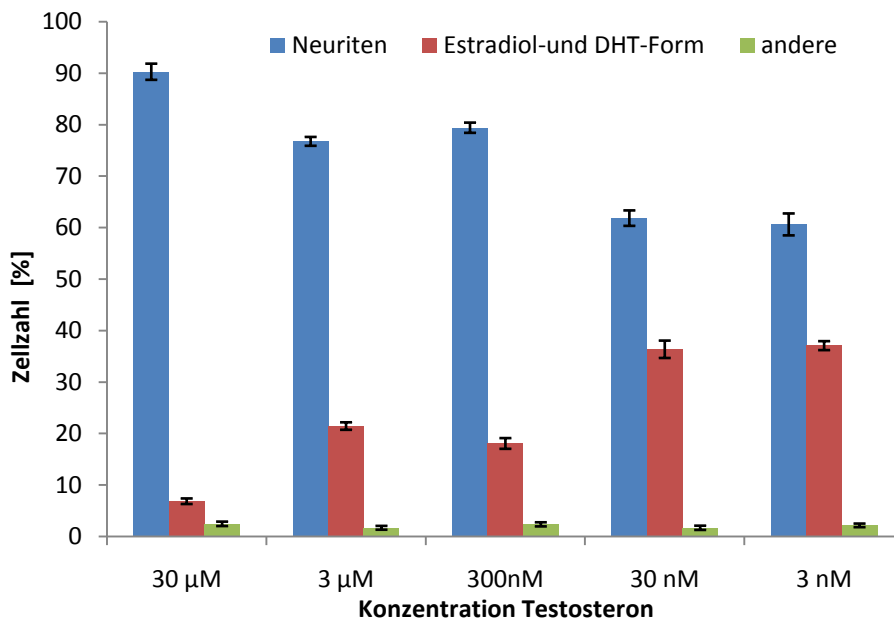


Diagramm 2: Konzentrationsreihe von Testosteron im Konzentrationsbereich 30 µM-3 nM. Als Kriterien für die Wirksamkeit der eingesetzten Testosteron-Konzentrationen wurde die Bildung von Neuriten, sowie Estradiol- und 5α -DHT-spezifischer Merkmale herangezogen. Statistik aus 4 unabhängigen Versuchsdurchgängen; es wurden jeweils 5 Gesichtsfelder (400x) ausgezählt.

3.4 Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf das Aktinskelett und die Beteiligung des Rho/Rac/Cdc42-Signalwegs

Die GTPasen der Rho-Familie sind eine der wichtigsten Regulatoren des Aktincytoskeletts in eukaryontischen Zellen. Die morphologischen Veränderungen, die während der neuronalen Entwicklung auftreten, werden durch die Rho-GTPasen reguliert. Rho-GTPasen sind die Schlüsselregulatoren neuronaler Entwicklungsprozesse (Luo, 2000). Eine Aktivierung von Rho führt zur Ausbildung von Stressfasern, zum Zurückziehen von Neuriten und zum Abrunden der Zelle. Das Auswachsen von Lamellipodien und Filopodien wird durch Aktivierung von Rac und Cdc42 induziert. Daher kann man Rho als negativen Regulator, Cdc42 und Rac als positive Regulatoren bezeichnen. Der Cdc42/Rac-Signalweg und der Rho-Signalweg stehen in einer inhibitorischen Beziehung zueinander (Luo, 1994). Die morphologischen Effekte, die die Rho-GTPasen auf das Mikrotubuliskelett ausüben, sind weitgehend unbekannt. Um zu untersuchen, ob die Steroide DHEA und Testosteron den

Rho-Signalweg induzieren, erfolgten die weiteren Untersuchungen hauptsächlich am Aktincytoskelett.

3.4.1 Induktion von Stressfasern

Morphologisch kann man Stressfasern in zentrale und periphere Stressfasern einteilen. Zentrale Stressfasern sind zentral im Zellkörper lokalisiert, periphere Stressfasern erstrecken sich entlang der Plasmamembran. Die Enden von Stressfasern sind in der Plasmamembran und den fokalen Adhäsionspunkten verankert. In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass zentrale Stressfasern sensitiver auf Rho-Kinase-Inhibitoren reagieren als auf MLCK- und Calmodulin-Inhibitoren. Auf der anderen Seite reagieren periphere Stressfasern sensitiver auf MLCK- und Calmodulin-Inhibitoren als auf Rho-Kinase-Inhibitoren. Man geht davon aus, dass die zentralen und peripheren Stressfasern durch zwei verschiedene Kinase-Systeme reguliert werden. Dieser Unterschied könnte in einem strukturellen und/oder funktionellen Unterschied begründet sein. Beide Typen von Stressfasern weisen unterschiedlich kontraktile Eigenschaften auf. Die MLCK-induzierte Stressfaserbildung verläuft wesentlich schneller und stärker als die Rho-Kinase-induzierte. Periphere Stressfasern sind auch wesentlich breiter als zentrale Stressfasern. Man geht von einer unterschiedlichen Lokalisation beider Kinasen aus (Kato, 2001). In beiden Fällen führt die Bildung von Stressfasern durch Aktin-Myosin-Interaktionen zu einer Rekontraktion von Neuriten oder Neuriten-ähnlicher Zellstrukturen.

3.4.1.1 Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Bildung von Stressfasern

Für die Untersuchungen des Aktinskeletts wurden differenzierte SH-SY5Y-Zellen verwendet, da morphologische Veränderungen in diesem Stadium besonders deutlich hervortreten. Retinolsäure induziert die Differenzierung von Neuroblastomazellen und führt zu einem Auswachsen von Neuriten. Daher stellen differenzierte SH-SY5Y-Zellen ein gutes Modell für die Untersuchung der Signalkaskaden dar, die an der Morphogenese dieser Zellen beteiligt sind. Retinolsäure induziert die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs (Lopez-Carballo, 2002). Dieser Signalweg führt wahrscheinlich zu einer Aktivierung von Rac1 und dem damit verbundenen Auswachsen von Neuriten (Pan, 2005). Zunächst wurden die Effekte von DHEA und Testosteron auf das Aktinskelett differenzierter SH-SY5Y untersucht. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit dem Rho-Kinase Aktivator Lysophosphatidsäure (LPA), dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 und dem Neuropeptid Bradykinin behandelt wurden. Die Behandlung differenzierter SH-SY5Y mit LPA führt zu einem Zurückziehen von Neuriten und zur Bildung von Stressfasern. Der LPA-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. SH-SY5Y-Zellen exprimieren zwei der LPA G-Protein gekoppelten Rezeptoren, EDG-2/vz-1 und EDG-4 (Sayas, 1999). Bradykinin führt in Neuroblastomazellen zu einer Aktivierung

von Rac ohne die Aktivierung von Cdc42 zu beeinflussen. Diese Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung der MHCs und letztendlich zum Auswachsen von Neuriten (Leeuwen, 1999).

Der kompetitive Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 inhibiert ROCK I/II. Die Behandlung von Zellen mit Y-27632 führt zu einer verminderten Phosphorylierung der MRLCs und zum Auswachsen von Neuriten. Neben löslichen Faktoren wie Sphingosin-1-phosphat ist auch LPA eine Komponente des Serums. Daher wurden alle Versuche unter Serum-freien Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde den Zellen 24 h vor den einzelnen Versuchen das Serum entzogen und die einzelnen Stimulationen mit Serum-freiem Medium durchgeführt.

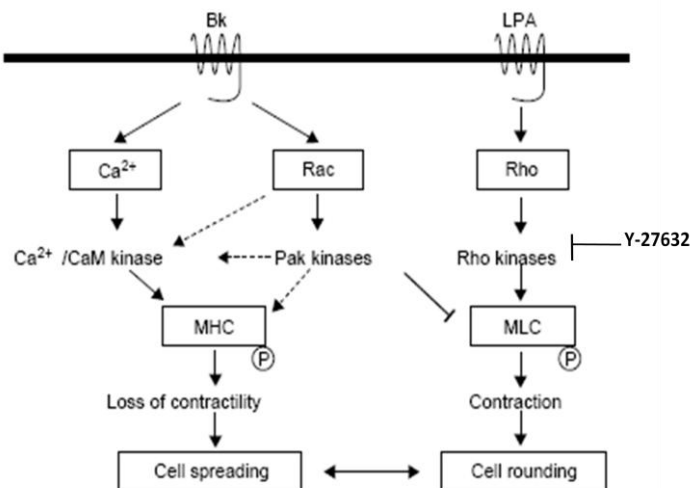


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Signalwege, die die Morphologie von Neuroblastomazellen bestimmen. Die Stimulierung mit LPA führt zu einer Aktivierung von Rho und zur Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins (MLC) durch Rho-Kinasen. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Kontraktilität von Aktinomyosin und letztendlich zur Zellabrundung. Dieser Weg wird durch den Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 blockiert. Stimulierung mit Bradykinin (Bk) führt auf der anderen Seite zu einer Aktivierung von Rac, einem Calcium-Signal und der Phosphorylierung der schweren Ketten des Myosins (MHC). Rac induzierte Aktivierung der Pak-Kinasen führt in Synergie mit den Calcium/Calmodulin (CaM)-regulierten Kinasen zu einer Phosphorylierung des MHC und zum Auswachsen von Zellausläufern. Ein Gleichgewicht zwischen Rho- und Rac-Weg bestimmt letztendlich die Morphologie von Neuroblastomazellen. Verändert nach (Leeuwen, 1999)

Kontrollzellen, die nur mit Serum-freiem Medium oder 30 Minuten mit 0,1% EtOH behandelt wurden, zeigen normal ausgeprägte periphere Stressfasern. Die zentralen Stressfasern sind nur schwach ausgebildet, und es kommt zu keiner erhöhten Bündelung von Aktinfilamenten. Die Zellen sind meist trigonal oder langgestreckt, ohne spezifische Ausläufer.

Bei der Behandlung der Zellen mit DHEA kommt es bei beiden eingesetzten Konzentrationen (30 μ M und 30 nM) zu einer starken Stressfaserbildung im zentralen Bereich. Die Aktinfilamente sind sehr stark gebündelt und die Zellen runden sich ab. Des Weiteren ist auch hier die Bildung von Filopodien zu beobachten.

Die Behandlung mit Testosteron führt dagegen zum Auswachsen von Neuriten. Zentrale Stressfasern sind kaum erkennbar und die Fasern im peripheren Bereich sind ebenfalls nur sehr schwach ausgeprägt. LPA induziert eine starke Erhöhung der zentralen und peripheren Stressfasern und führt zu einem Abrunden der Zellen, wie es bei der Behandlung mit DHEA zu beobachten war. Y-27632 und Bradykinin führen zur Ausbildung von Neuriten und die

Zellen sind stark untereinander vernetzt. Zentrale Stressfasern sind kaum noch zu beobachten, die peripheren sind sehr schwach ausgeprägt, wie es bei Testosteron zu beobachten ist.

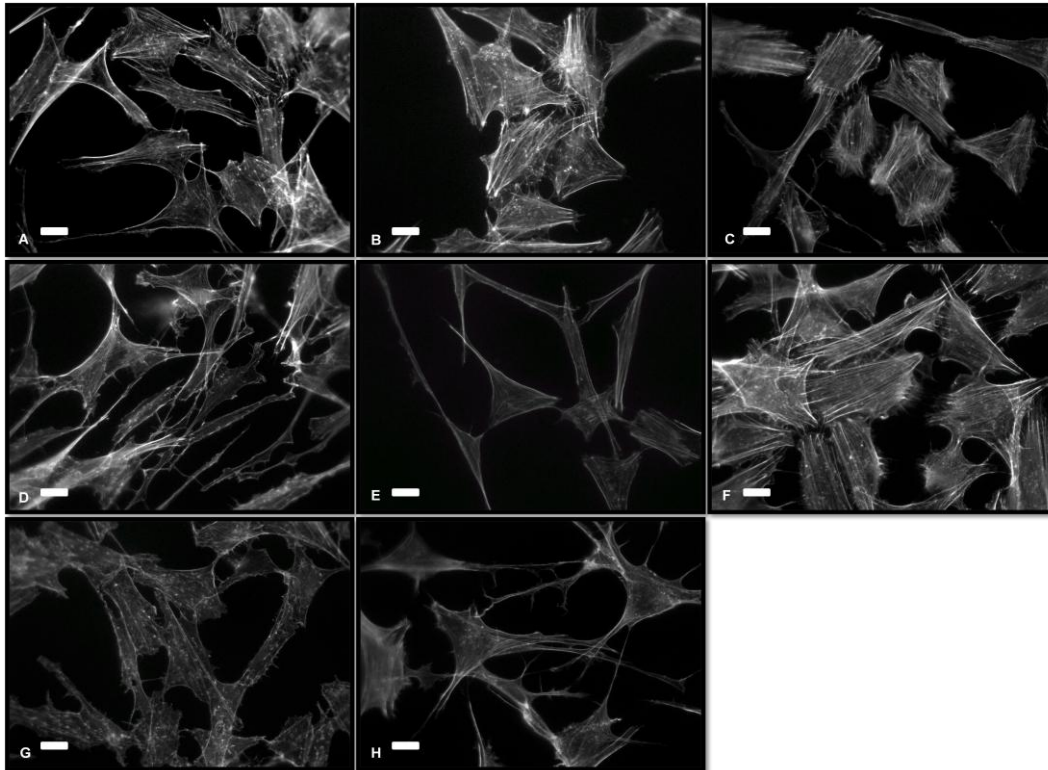


Bild 17: Aktinfärbung von mitteldifferenzierten SH-SY5Y mit Phalloidin-FITC (400x). **(A)** 30 min 0,1% EtOH; **(B)** 30 min DHEA 30 nM; **(C)** 30 min DHEA 30 µM; **(D)** 30 min Testosteron 3 nM; **(E)** 30 min Testosteron 30 µM; **(F)** 30 min LPA 10 µM; **(G)** 30 min Y-27632 10 µM; **(H)** 30 min Bradykinin 1 µM. Balken: 10 µm

3.4.1.2 Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Bildung zentraler und peripherer Stressfasern

Bei der Behandlung der Zellen mit LPA und DHEA treten massive Stressfasern sowohl im zentralen als auch peripheren Bereich auf. Bei der Behandlung der Zellen mit Testosteron vermindert sich die Anzahl der zentralen Stressfasern sehr stark. Um zu testen, ob die Steroide eher zentrale oder periphere Stressfasern induzieren, wurden die Zellen vor der Zugabe der Steroide mit dem PI3-Kinase- und MLCK-Inhibitor Wortmannin behandelt. Nach 5 Minuten Vorinkubation mit 1 µM Wortmannin wurden den Zellen die Steroide DHEA und Testosteron zugesetzt. Die mit Wortmannin behandelten Zellen zeigen schwächer ausgeprägte periphere Stressfasern entlang der Plasmamembran. Die Ausprägung der zentralen Stressfasern ist mit denen der Kontrollzellen vergleichbar. Durch die Zugabe von 30 nM DHEA ist eine verstärkte Bildung zentraler Stressfasern zu beobachten. Die peripheren Filamente werden durch die Zugabe von DHEA nicht beeinflusst. Überraschender Weise führte die Zugabe von 3 nM Testosteron nicht zur weiteren Reduktion von Stressfasern und auch nicht zum Auswachsen von Neuriten. Diese Zellen ähnelten stark den Kontrollzellen.

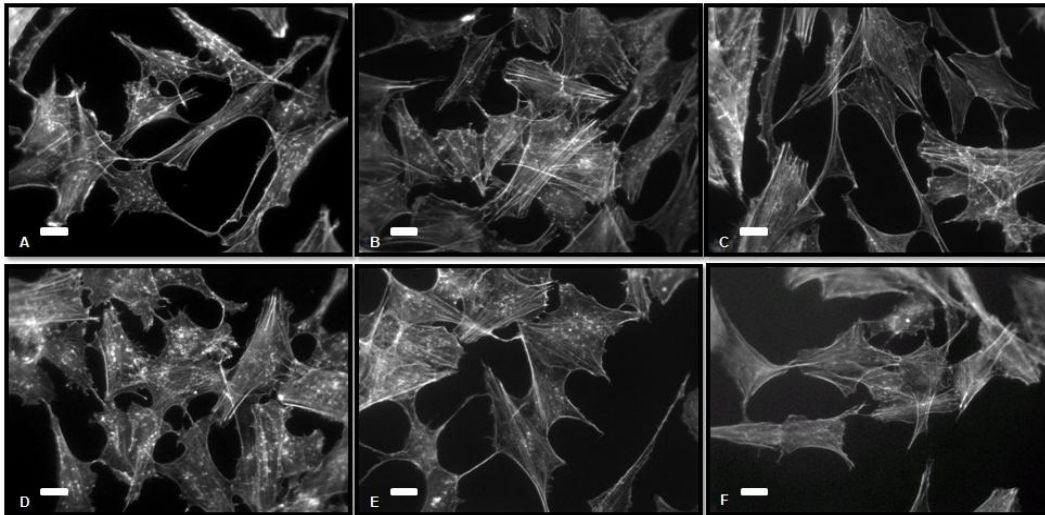


Bild 18: Aktinfärbung von mitteldifferenzierten SH-SY5Y mit Phalloidin-FITC (400x). (A) 1 μ M Wortmannin; (B) 30 nM DHEA; (C) 3 nM Testosteron; (D) 1 μ M Wortmannin + 30 nM DHEA; (E) 1 μ M Wortmannin + 3 nM Testosteron; (F) 0,1% EtOH. Balken: 10 μ m

Zusammenfassend führt die Behandlung der Zellen mit DHEA zur verstärkten Bildung von Stressfasern, vergleichbar mit der Stressfaserinduktion durch die Zugabe von LPA. Testosteron hingegen führt zu einer verminderten Bildung von Stressfasern, vergleichbar der Reduktion durch Y-27632 und Bradykinin. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass trotz der Inhibierung der PI3-Kinase und der MLCK, DHEA zentrale Stressfasern induzierte. Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation mit Testosteron unter diesen Umständen nicht zum Verlust von Stressfasern und nicht zum Auswachsen von Neuriten.

3.4.1.3 Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Bildung von Stressfasern in Abhängigkeit des Rho-Aktivators LPA und dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632

Die Ergebnisse aus 3.4.1.2 und 3.4.1.3 lassen den Schluss zu, dass DHEA eine Aktivierung des Rho-Signalwegs über die Rho-Kinase induzieren könnte. Testosteron hingegen scheint einen inhibitorischen Effekt auf diesen Signalweg über eine Inhibierung des Rho-Proteins, einer der Rho-Kinasen oder die Aktivierung von Rac1 auszuüben. Vermutlich ist die Wirkung von Testosteron abhängig von der Aktivität der PI3-Kinase. Daher wurden die Steroide in Kombination mit dem Rho-Aktivator bzw. dem Rho-Kinase Inhibitor getestet. Zunächst wurden die Zellen 10 Minuten mit dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 vorinkubiert und dann für 30 Minuten mit DHEA behandelt.

Die Behandlung der Zellen mit DHEA führt in Kombination mit Y-27632 weder zur verstärkten Bildung von Stressfasern, noch zur Bildung von Filopodien. Dennoch kann ein Abrunden der Zellen oder eine Verkleinerung des Zellkörpers beobachtet werden. In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen 30 Minuten mit 3 nM Testosteron vorinkubiert und dann mit LPA behandelt. Die erwartete Bildung von Stressfasern und das Abrunden der Zellen sind in diesem Versuchsansatz nicht zu beobachten. Werden die Zellen mit LPA und DHEA

behandelt, kommt es im Vergleich zu den Einzelbehandlungen, zu einer Verstärkung der Stressfaserbildung und zur Kontraktion der Zellen.

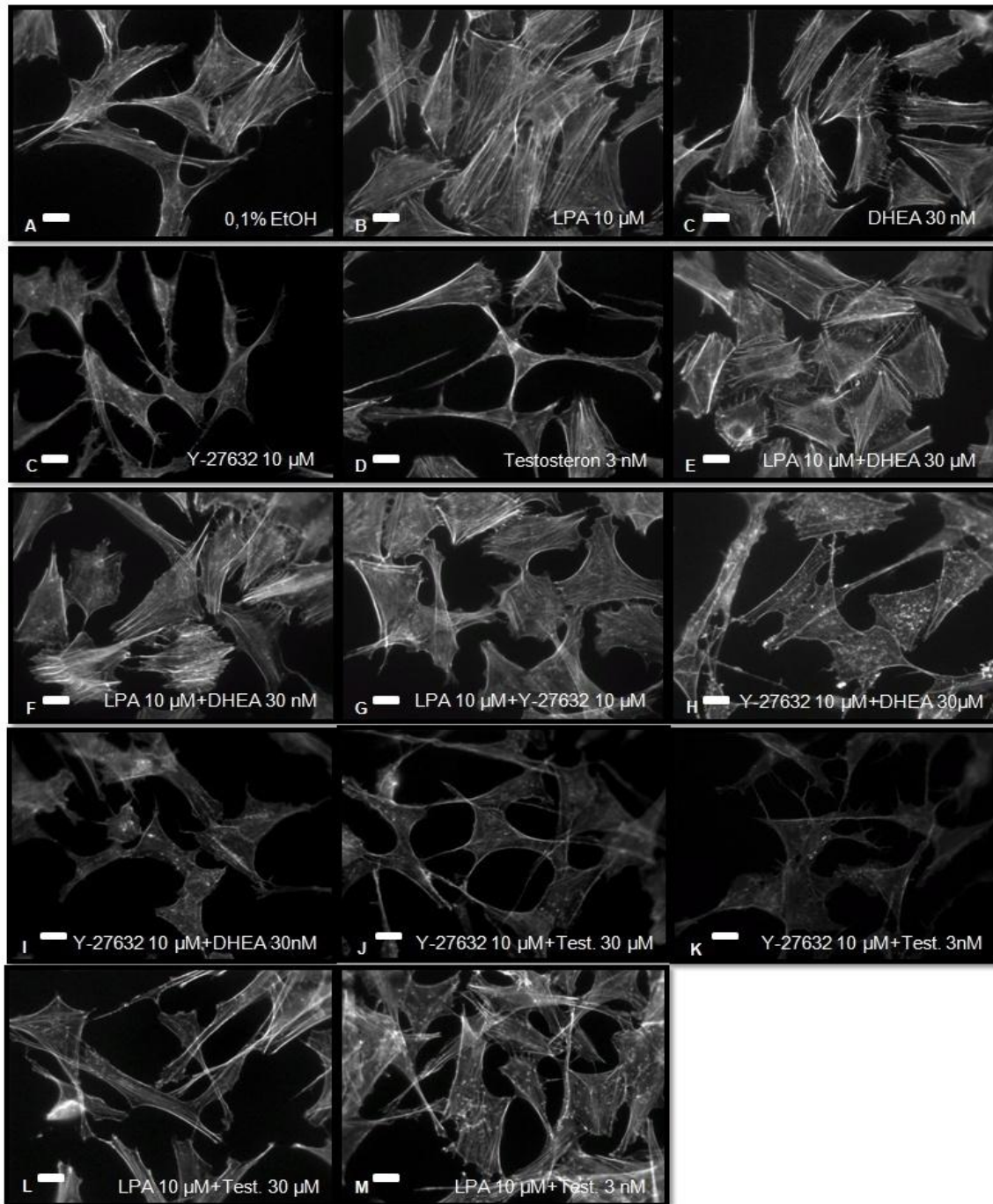


Bild 19: Aktinfärbung von mitteldifferenzierten SH-SY5Y mit Phalloidin-FITC (400x).

Im Gegensatz dazu kommt es bei einer Kombination von Y-27632 und Testosteron zu einer noch stärkeren Abschwächung der Stressfaserbildung, als es bei den jeweiligen Einzelbehandlungen der Fall ist. Eine Kombination von LPA und Y-27632 führt zu einer normalen Ausprägung von Stressfasern, wie sie bei Kontrollzellen zu beobachten ist. Eine Inhibierung der Rho-Kinase durch Y-27632 führt somit zu einer teilweisen Inhibierung der Steroidwirkung von DHEA. Es kommt nicht zu einer erhöhten Bildung von Stressfasern, aber

zum Abrunden der Zellen. Andererseits inhibiert Testosteron die Kontraktion der Zellen und die Stressfaserbildung, die normalerweise nach Stimulation mit LPA über eine Aktivierung des Rho-Signalwegs induziert werden. Die Effekte von LPA können darüberhinaus durch DHEA und die Effekte von Y-27632 durch Testosteron gesteigert werden.

3.4.1.4 Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Bildung von Stressfasern in Abhängigkeit des Rac-Aktivators Bradykinin

Die Stimulierung neuronaler Zellen mit Bradykinin führt zu einer Aktivierung von Rac. Diese Aktivierung ist Calcium-abhängig und induziert eine erhöhte Phosphorylierung der MHCs. Eine erhöhte Phosphorylierung der MHC führt dann zum Auswachsen von Neuriten (Leeuwen, 1999). Das Auswachsen der Neuriten kommt durch eine verminderte kortikale Spannung und dem Herauslösen von F-Aktin aus den Actinomyosin-Komplexen zustande. Dieser Prozeß wird zusätzlich von einem Verlust an Myosin II in den kortikalen Regionen der Zellen begleitet. Um eine Stimulation des Rac-Signalwegs zu induzieren, wurden differenzierte SH-SY5Y mit Bradykinin behandelt. Des Weiteren wurde untersucht, ob es durch zusätzliche Zugabe von Testosteron zu einer Verstärkung des Bradykinin-Effekts bzw. durch Zugabe von DHEA zu einer Inhibierung des beobachteten Effekts kommt. Die Stimulation der MHC-Phosphorylierung durch Bradykinin erfolgt sehr schnell. In PC12 Zellen erreicht sie ihr Maximum nach 2-5 Minuten und sinkt nach 40 Minuten wieder auf ihren Basiswert ab (Leeuwen, 1999). Daher wurden differenzierte SH-SY5Y vor der Zugabe der Steroide mit 1 μ M Bradykinin für 5 Minuten vorinkubiert.

Die Stimulation der Zellen mit Bradykinin führt bei SH-SY5Y-Zellen zum Auswachsen von Neuriten und zu einer verstärkten Vernetzung der Zellen. Diese morphologischen Eigenschaften sind bereits nach 5 Minuten zu beobachten. Eine Abschwächung der morphologischen Effekte von Bradykinin nach 30 Minuten konnte nicht beobachtet werden. Durch die Zugabe von 30 nM DHEA kommt es zu einer massiven Bildung von peripheren und zentralen Stressfasern und zum Abrunden der Zellen. Auch bei der Zugabe von 10 μ M LPA kommt es zur starken Ausbildung zentraler und peripherer Stressfasern und zur Rückbildung der Zellausläufer. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung der Zellen mit 3 nM Testosteron und 10 μ M Y-27632 zu einem erhöhten Auswachsen von Neuriten und zur weiteren Reduzierung von Stressfasern. Die Inkubation der Zellen mit DHEA und LPA führt somit zu einer Inhibierung der durch Bradykinin induzierten Effekte. Die Inkubation der Zellen mit Testosteron und Y-27632 führt zu einer leichten Verstärkung der durch Bradykinin induzierten Effekte.

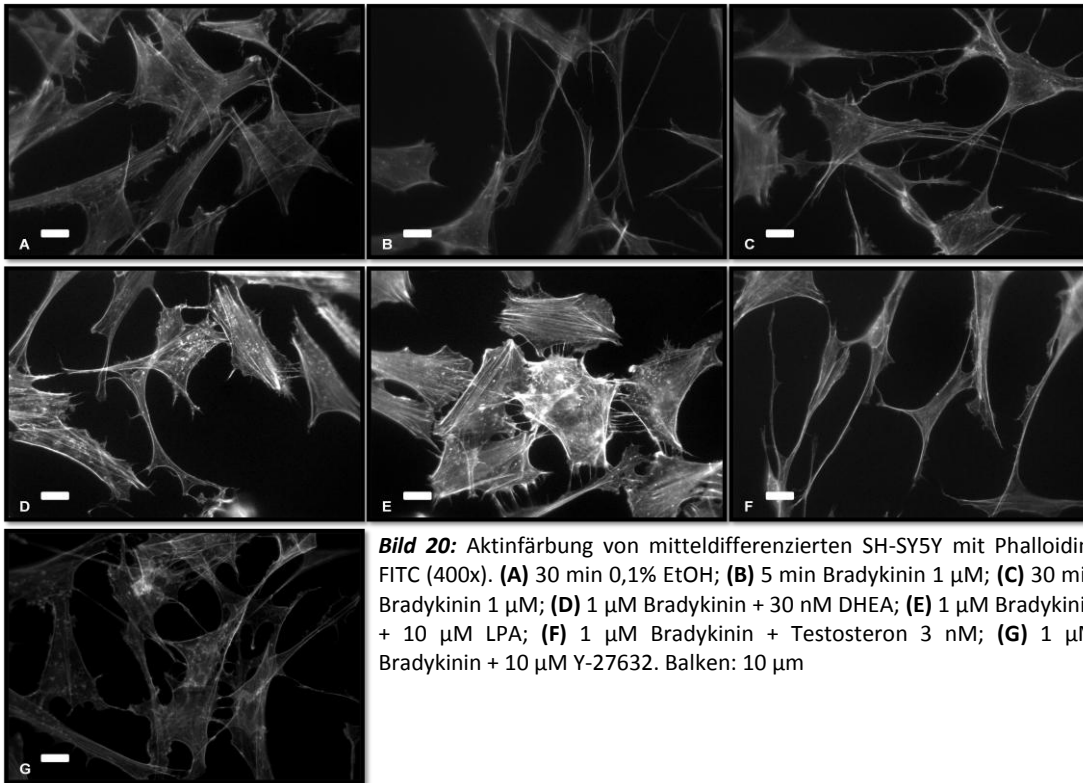


Bild 20: Aktinfärbung von mitteldifferenzierten SH-SY5Y mit Phalloidin-FITC (400x). (A) 30 min 0,1% EtOH; (B) 5 min Bradykinin 1 μ M; (C) 30 min Bradykinin 1 μ M; (D) 1 μ M Bradykinin + 30 nM DHEA; (E) 1 μ M Bradykinin + 10 μ M LPA; (F) 1 μ M Bradykinin + Testosteron 3 nM; (G) 1 μ M Bradykinin + 10 μ M Y-27632. Balken: 10 μ m

3.4.1.5 Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Bildung von Stressfasern in Abhängigkeit des PKA- und Rho-Kinase Inhibitors H89

Die Stressfaserbildung und das Zurückziehen von Zellausläufern wird von Rho über die beiden bereits erwähnten Rho-Kinasen I+II induziert. Die Protein Kinase A stellt einen Effektor von Rho dar. Eine Aktivierung der PKA führt zu einer Inhibierung von Rho und induziert somit das Auswachsen von Zellausläufern (Dong, 1998). Das Isoquinolon H89 stellt einen selektiven Inhibitor der PKA dar. Dennoch konnte gezeigt werden, dass H89 auch die Rho-Kinase II inhibiert (Davies, 2000). Durch die Inhibierung der PKA müsste es somit zu einem Zurückziehen der Zellausläufer kommen. H89 induziert in Neuroblastomazellen aber das Auswachsen von Neuriten. Man kann davon ausgehen, dass der inhibitorische Effekt von H89 auf die Rho-Kinasen die Inaktivierung der PKA und die damit verbundenen Effekte maskiert. In Vergleichsstudien zwischen dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 und H89 konnte man beobachten, dass beide Inhibitoren identische Effekte aufwiesen. Sie induzieren das Auswachsen von Neuriten und verursachen identische Änderungen in der Verteilung der cytoskelettalen Proteine F-Aktin, Neurotubulin und MAP-2. Außerdem blocken sie das Zurückziehen von Zellausläufern, dass durch das *E.coli* Toxin CNF1 induziert wird. CNF1 stellt einen Rho-Aktivator dar. Man geht in diesem Fall davon aus, dass der Effekt der Inhibitoren über eine Inaktivierung der Rho-Kinasen I+II läuft. PKI, ein selektives Inhibitor Peptid der PKA, konnte diese Effekte nicht induzieren. Weiterhin inhibiert Y-27632 neben den Rho-Kinasen I+II die Protein Kinase N (PKN), aber

nicht die PKA. Im Gegensatz dazu inhibiert H89 die PKA und die Rho-Kinase II (wahrscheinlich auch Rho-Kinase I) aber nicht die PKN. Aus diesem Grunde geht man davon aus, dass beide das Auswachsen von Zellausläufern über die Inhibierung beider Rho-Kinasen induzieren. Beide Inhibitoren konnten jedoch ein durch konstitutiv aktives Rho induziertes Zurückziehen von Neuriten nicht blockieren. Der gleiche Effekt konnte für überexprimiertes Wildtyp RhoA gezeigt werden. Y-27632 und H89 unterdrückten aber die Bildung von Stressfasern bei konstitutiv aktiviertem Rho (Leemhuis, 2002). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die Stressfaserbildung und das Zurückziehen von Zellausläufern unabhängig voneinander sind und wahrscheinlich noch von weiteren Effektoren abhängen. Ein weiterer kritischer Faktor in der Stressfaserbildung stellt der Rho-Effektor mDia dar. Man konnte feststellen, dass bei einer Inhibierung von Rho durch die C3 Exotransferase es zu keiner Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen kam. Dieser Effekt konnte dann aber durch die Expression konstitutiv aktiviertem mDia rückgängig gemacht werden (Riveline, 2001). Die Bildung von Rho-induzierten Stressfasern bedingt demnach die Präsenz aktiver Rho-Kinasen oder mDia, während das Zurückziehen von Zellausläufern auch ohne aktive Rho-Kinasen und mDia induziert werden kann (Leemhuis, 2002).

Ausgehend von diesem Modell wurde in den folgenden Versuchen untersucht, ob die Steroide DHEA und Testosteron die Aktivität von Rho und/oder den Rho-Kinasen beeinflussen. Zunächst wurden differenzierte SH-SY5Y-Zellen für 30 Minuten mit 10 μM H89 inkubiert und die Morphologie anhand einer Mikrotubuli-Färbung untersucht.

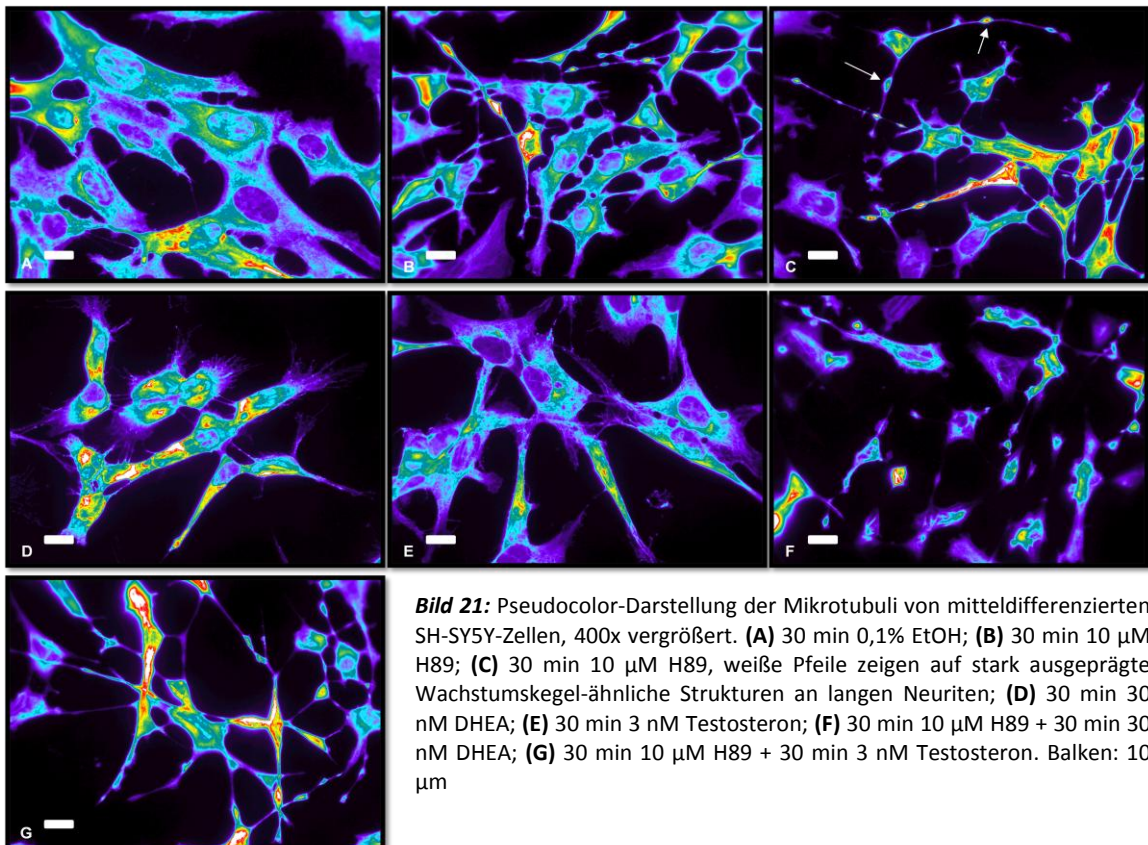


Bild 21: Pseudocolor-Darstellung der Mikrotubuli von mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen, 400x vergrößert. (A) 30 min 0,1% EtOH; (B) 30 min 10 μM H89; (C) 30 min 10 μM H89, weiße Pfeile zeigen auf stark ausgeprägte Wachstumskegel-ähnliche Strukturen an langen Neuriten; (D) 30 min 30 nM DHEA; (E) 30 min 3 nM Testosteron; (F) 30 min 10 μM H89 + 30 min 30 nM DHEA; (G) 30 min 10 μM H89 + 30 min 3 nM Testosteron. Balken: 10 μm

Eine Behandlung differenzierter SH-SY5Y-Zellen mit H89 führt zum Auswachsen langer Neuriten mit Wachstumskegel-ähnlichen Strukturen. Teilweise sind auch Lamellipodien zu erkennen, wie sie vereinzelt auch nach Behandlung der Zellen mit Y-27632 auftreten. Bei einer Kombination von H89 und 30 nM DHEA kann eine deutliche Abrundung und starke Verkleinerung der Zellen beobachtet werden. In Kombination mit 3 nM Testosteron kommt es zu einer Verstärkung des Effektes von H89. Die Zellen bilden dann noch längere Neuriten mit Wachstumskegel-ähnlichen Strukturen aus. Außerdem werden mehr Zell-Zell-Kontakte ausgebildet, die zu einer stärkeren Vernetzung der Zellen führen.

Die Untersuchung des Aktinskeletts zeigt deutlich, dass es nach der Behandlung mit H89 zur Ausbildung langer Neuriten mit Wachstumskegel-ähnlichen Strukturen und Lamellipodien kommt. Werden die Zellen in Kombination mit H89 und 30 nM DHEA behandelt, verkleinern sich die Zellkörper extrem und die Zellen runden sich ab. Es werden jedoch keinerlei Stressfasern gebildet. Bei der Kombination von H89 und 3 nM Testosteron wird der Effekt von H89 verstärkt. Wie schon bei der Mikrotubulifärbung zu beobachten war, bilden sich sehr lange Neuriten mit Wachstumskegel-ähnlichen Strukturen und die Zahl der Zell-Zell-Kontakte nimmt deutlich zu. Im Vergleich zum Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 zeigt H89 identische Effekte, sowohl auf die Morphologie als auch auf das Aktinskelett der Zellen. Es kommt bei der alleinigen Behandlung der Zellen mit H89 ebenfalls zum Auswachsen von Neuriten und zu einer Verminderung von Stressfasern. In Kombination mit DHEA zeigen Y-27632 und H89 behandelte Zellen ein Abrunden oder eine deutliche Verkleinerung der Zellkörper, aber keine Bildung von zentralen oder peripheren Stressfasern.

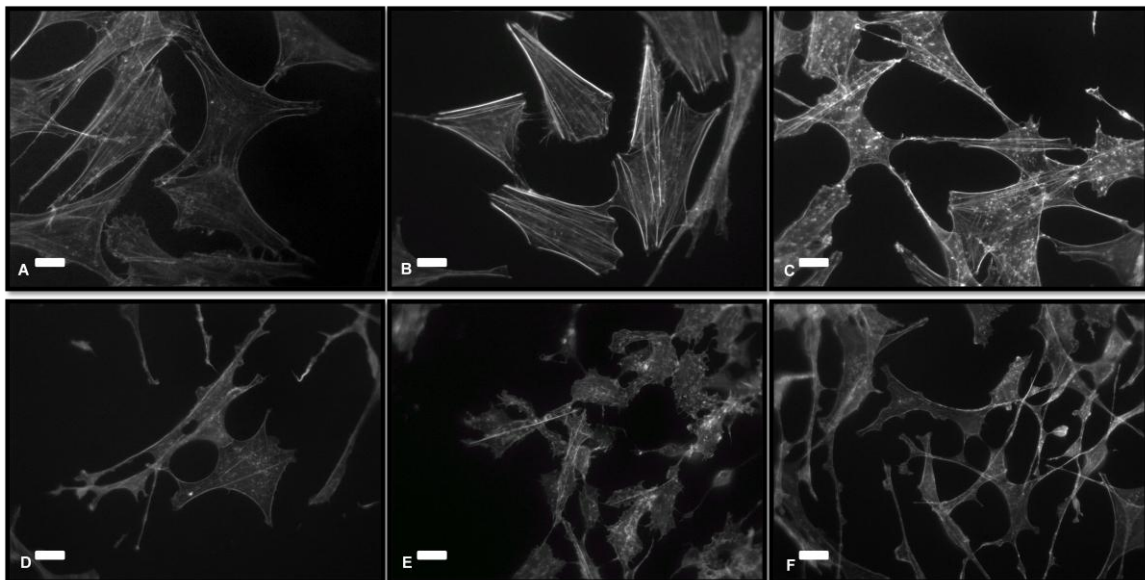


Bild 22: Aktinfärbung von mitteldifferenzierten SH-SY5Y mit Phalloidin-FITC (400x). **(A)** 30 min 0,1% EtOH; **(B)** 30 min 30 nM DHEA; **(C)** 30 min 3 nM Testosteron; **(D)** 30 min 10 μ M H89; **(E)** 30 min 10 μ M H89 + 30 min 30 nM DHEA; **(F)** 30 min 10 μ M H89 + 30 min 3 nM Testosteron. Balken: 10 μ m

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das durch DHEA verursachte Zurückziehen der Zellausläufer unabhängig von den Rho-Kinasen stattfindet, die Bildung der Stressfasern

aber eine Aktivierung der Rho-Kinasen voraussetzt. Im Gegensatz dazu verstärkt Testosteron sowohl die Effekte von Y-27632 als auch die von H89.

3.4.2 Der Einfluss von DHEA und Testosteron auf die Induktion von fokalen Adhäsionskomplexen

Rho reguliert neben der Bildung von Stressfasern auch die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen. Fokale Adhäsionskomplexe sind eng mit den Aktin-Stressfasern assoziiert und abhängig von den Integrinen. Sie regulieren nicht nur die Zelladhäsion, sondern stellen auch wichtige Initiatoren der Signaltransduktion dar. Fokale Adhäsionskomplexe sind dynamische Strukturen, die Assemblieren und Deassemblieren. Ihre Assemblierung oder Deassemblierung wird durch Rho, Rac1 und Cdc42 reguliert. Die Modulation von fokalen Adhäsionskomplexen durch Rho oder Cdc42 setzt eine Aktivierung der Rho-Kinase und der Serin/Threonin-Kinase MRCK voraus. MRCKs sind Cdc42-spezifische Effektorproteine, die eine PH-Domäne und eine Kinase-Domäne besitzen, die mit der von ROK identisch ist und somit auch die MLCs phosphorylieren kann (Dong, 1998). Rho induziert auch die Synthese von PIP_2 . PIP_2 ist ebenso in die Stressfaserbildung und die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen involviert. PIP_2 verknüpft vermutlich die Aktinfilamente mit cytoskelettalen Proteinen (z.B. Vinculin, Talin), die in den fokalen Adhäsionspunkten lokalisiert sind (Gilmore, 1996). Ein weiterer Effektor von Rho ist mDia. Die katalytische Domäne von ROK alleine kann keine korrekt organisierten Stressfasern induzieren. Diese Induktion bedingt eine zusätzliche Aktivierung von mDia (Riveline, 2001). mDia bindet an das G-Aktin bindende Protein Profilin und es kommt zur erhöhten Polymerisierung von Aktin und Organisation von F-Aktin zu Stressfasern (Watanabe, 1999) (Wasserman, 1998).

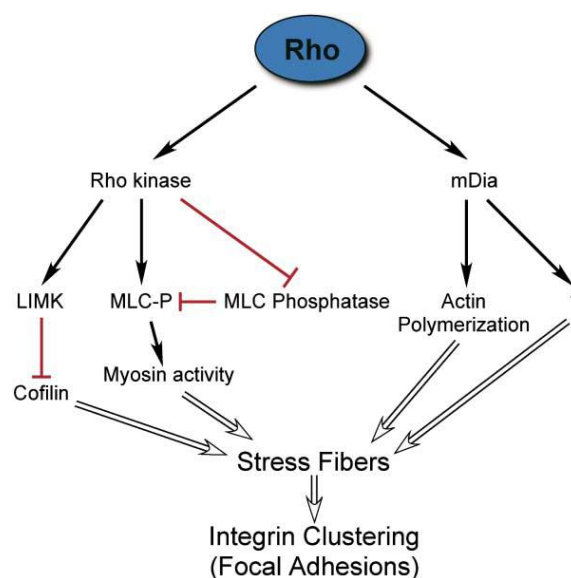


Abbildung 33: Die Signalweiterleitung von Rho zum Aktincytoskelett und die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen. Details siehe Text (Burrige, 2004).

Im folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob es durch die Stimulation der Zellen mit DHEA neben den bereits beobachteten Stressfasern auch zur Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen kommt. Dazu wurde eine Doppelfärbung der Zellen durchgeführt. Der Nachweis von fokalen Adhäsionskomplexen erfolgte über eine Anti-Vinculin-Färbung. Um die Colokalisation der fokalen Adhäsionskomplexe mit dem Aktinskelett nachzuweisen, erfolgte eine zweite Färbung mit Phalloidin-FITC gegen Aktin.

Die fokalen Adhäsionskomplexe sind bei Kontrollzellen nur vereinzelt zu beobachten und befinden sich dann in der Peripherie der Zelle. Eine Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA und 10 μ M LPA führt neben der massiven Ausbildung von Stressfasern zur erhöhten Bildung von großen fokalen Adhäsionskomplexen, die meist in der Peripherie, seltener im Zentrum der Zelle lokalisiert sind. Die Kombination von 30 nM DHEA und 10 μ M LPA führt, wie erwartet, zu einer verstärkten Bildung von großen fokalen Adhäsionskomplexen. Auch hier sind die Komplexe sowohl in der Peripherie als auch zentral zu beobachten. Die Behandlung der Zellen mit dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 führt zur Ausbildung eines neuronartigen Zelltyps. Wie erwartet, sind hier keinerlei Stressfasern und fokale Adhäsionskomplexe zu detektieren. Die Kombination von Y-27632 und 30 nM DHEA führt weder zur Reorganisation von Stressfasern noch zur Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen.

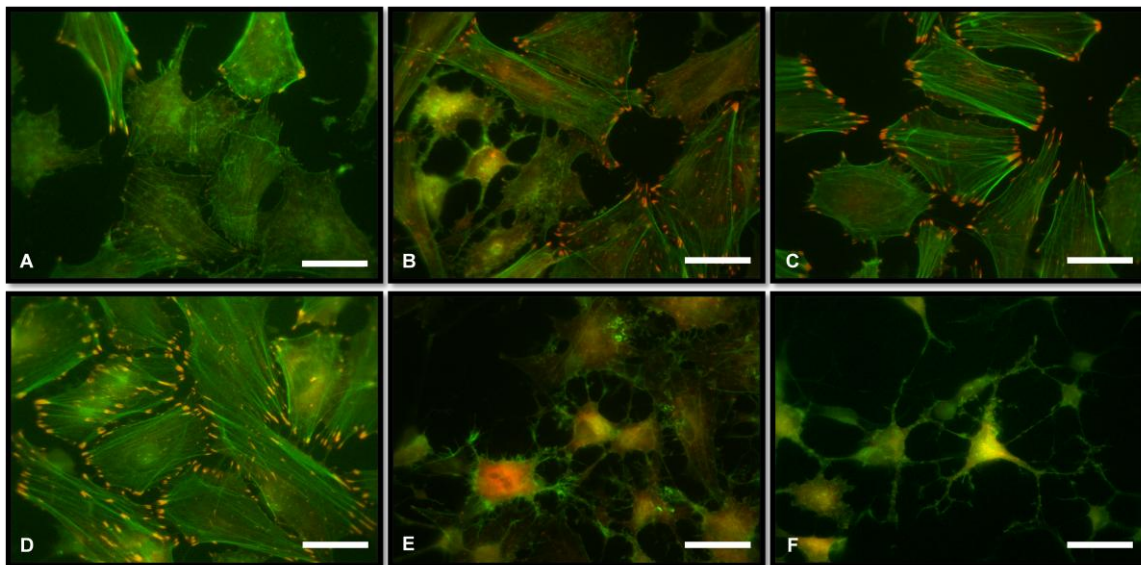


Bild 23: Doppelfärbung von Aktin (grün) und Vinculin (rot) in differenzierten SH-SY5Y. Die roten Strukturen der Vinculin-Färbung markieren die fokalen Adhäsionskomplexe; **(A)** 30 min 0,1% EtOH; **(B)** 30 min 30 nM DHEA; **(C)** 30 min 10 μ M LPA; **(D)** 30 min 10 μ M LPA + 3 min 30 nM DHEA; **(E)** 30 min 10 μ M Y-27632; **(F)** 30 min 10 μ M Y-27632 + 30 min 30 nM DHEA. Balken: 10 μ m

3.5 Expression der MRLCs in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades in SH-SY5Y

Die Aktivität von Myosin II wird durch die Rho-GTPasen und die Phosphorylierung der MRLCs reguliert. Myosin besteht (wie in 1.1.2 beschrieben) aus zwei schweren Ketten (MHCs) und zwei Paar essentiellen (MELCs) und zwei Paar regulatorischen Leichten Ketten (MRLCs). Die Motorfunktion von Myosin II wird u.a. durch eine Phosphorylierung an der MRLC (Ser19) positiv beeinflusst (Kendrick-Jones). Der Ser19-Rest der MRLC wird durch die Rho-Kinasen phosphoryliert. Die Rho-Kinasen können den Phosphorylierungsstatus der MRLC indirekt und direkt regulieren. Der indirekte Weg verläuft über eine inhibitorische Phosphorylierung der MLC-Phosphatase (Amano, 1998) (Feng, 1999), der andere Weg über eine direkte Phosphorylierung der MRLC durch die Rho-Kinase (Ueda, 2002). Da die vorhergehenden Ergebnisse auf eine Beteiligung der Rho-GTPasen an den DHEA und Testosteron induzierten Effekten schließen lassen, wurden in den folgenden Abschnitten zunächst die Expression und die Lokalisation der MRLCs unter dem Einfluss von Differenzierungsgrad und Steroidstimulation untersucht.

Bei biochemischen Untersuchungen mittels Westernblot konnte nachgewiesen werden, dass in SH-SY5Y-Zellen in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades drei Isoformen der MRLC exprimiert werden. Durch Fraktionierung der Proteine in cytosolische Proteine, Proteine aus Membranen und Organellen, Kernproteine und Proteine des Cytoskeletts konnte zudem gezeigt werden, dass die MRLCs in den einzelnen Kompartimenten unterschiedlich stark exprimiert werden und deren Lokalisation durch Steroidstimulation verändert wird.

Die Untersuchungen an undifferenzierten, fraktionierten SH-SY5Y-Zellen ergeben, dass in diesem Differenzierungsstadium zunächst nur zwei Isoformen der MRLCs (18 kDa und 24 kDa) exprimiert werden. Anhand der Fraktionierung der Zell-Lysate kann festgestellt werden, dass die 18 kDa Isoform in allen vier Kompartimenten exprimiert wird. In den Fraktionen des Kerns und des Cytoskeletts ist gegenüber der Cytosol- und der Membran- und Organellen-Fraktion eine wesentlich stärkere Expression zu beobachten.

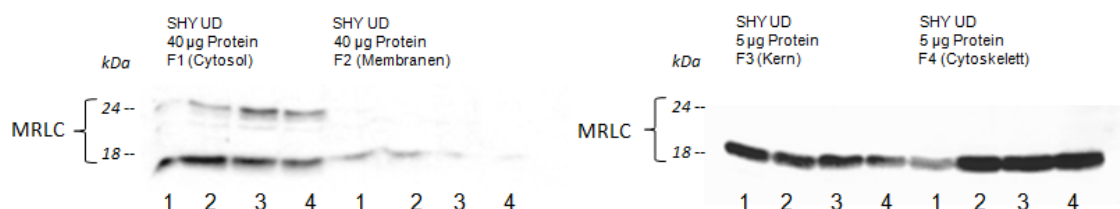


Bild 24: Nachweis der regulatorischen leichten Ketten von Myosin II (MRLCs) in undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen verschiedener Fraktionen in Abhängigkeit von der 30 minütigen Stimulation mit verschiedenen Substanzen. **(1)** 0,1% EtOH ; **(2)** 3 nM Testosteron; **(3)** 30 nM DHEA; **(4)** 10 µM Y-27632

Zusätzlich erfolgt ein Effekt der Steroide bzw. des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 auf die Expressionsrate der MRLC. In undifferenzierten SH-SY5Y wird die größere Isoform mit dem

apparenten Molekulargewicht von ca. 24 kDa in der Cytosol-Fraktion von Kontrollzellen und mit 3 nM Testosteron stimulierten Zellen nur sehr schwach exprimiert. Bei der Stimulation von 30 nM DHEA und 10 μ M Y-27632 hingegen wird diese Isoform in dieser Fraktion stärker exprimiert. Auch die Expression der 18 kDa Isoform wird unterschiedlich reguliert. Hier tritt bei Kontrollzellen und Testosteron-stimulierten Zellen eine verstärkte Expression in der Cytosol- und Membran-Fraktion auf. Nach Stimulation der Zellen mit DHEA und Y-27632 wird diese Isoform in der Membran-Fraktion nicht exprimiert. Die 24 kDa Isoform fehlt in dieser Fraktion und diesem Differenzierungsstadium völlig. In der Kern- und Cytoskelett-Fraktion wird die Expression der 18 kDa Isoform durch eine Stimulation der Zellen mit den einzelnen Substanzen nicht verändert.

Die Expression der MRLC im Kern überraschte zunächst sehr. Um die Reinheit der einzelnen Fraktionen zu überprüfen, wurden sogenannte Markerproteine (Myosin IIA und Histon-Deacetylase 1) mittels Western Blot untersucht.

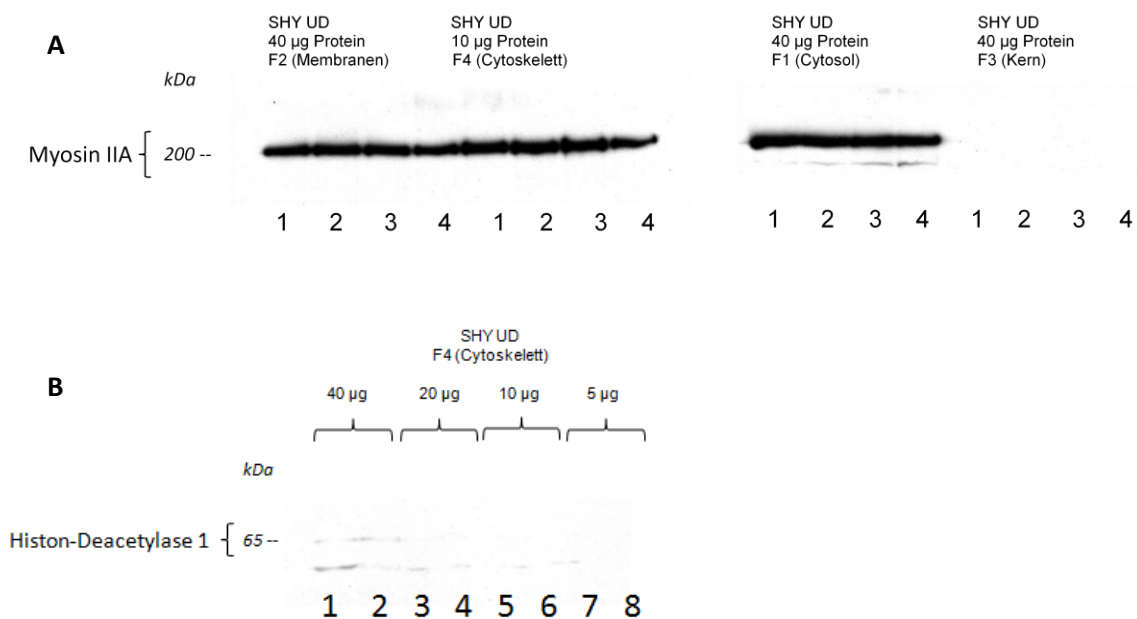


Bild 25: Überprüfung der Reinheit einzelner Fraktionen mittels Markerproteine im Western Blot. **(A)** Nachweis von Myosin IIA (200 kDa) in den einzelnen Protein-Fractionen. Myosin IIA wurde in der Cytosol-, Membran- und Cytoskelett-Fraktion detektiert, in der Kern-Fraktion ist kein Myosin IIA nachzuweisen. **(B)** Nachweis der Histon-Deacetylase 1 (Kernprotein) in der Cytoskelett-Fraktion. Es wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen aufgetragen. Die Histon-Deacetylase ist bei keiner der einzelnen Proteinmengen in der Cytoskelett-Fraktion nachzuweisen.

Myosin IIA wird nicht im Zellkern exprimiert und dient somit zur Untersuchung der Reinheit der Kern-Fraktion. Wie in Bild 25 A zu erkennen ist, kann Myosin IIA in der Kern-Fraktion nicht nachgewiesen werden. Die Kern-Fraktion ist demnach nicht mit Proteinen der anderen Fraktionen verunreinigt.

Die Histon-Deacetylase 1 ist ein Protein, das nur im Zellkern exprimiert wird. Dieser Nachweis diente zur Überprüfung der Reinheit der Cytoskelett-Fraktion. Wie in Bild 25 B zu

erkennen ist, kann die Histon-Deacetylase 1 (65 kDa) in der Cytoskelett-Fraktion nicht nachgewiesen werden. Laut Herstellerangaben kommt es bei dem hier verwendeten Antikörper zur Detektion einer zweiten Bande mit niedrigerem Molekulargewicht. Diese Bande ist bei höheren Proteinkonzentrationen schwach zu erkennen. Hierbei handelt es sich jedoch um eine unspezifische Antikörper-Bande.

Die Untersuchung der MRLC an mitteldifferenzierten Zellen zeigt, dass die 18 kDa und die 24 kDa Isoform sowohl in der Cytosol- als auch in der Membran-Fraktion in diesem Stadium wesentlich stärker exprimiert werden, als im undifferenzierten Stadium. Auch hier bestätigt sich nach der Behandlung der Zellen mit 30 nM DHEA und 10 μ M Y-27632, dass die 24 kDa Isoform im Vergleich zu den Kontrollen und den mit 3 nM Testosteron behandelten Zellen wesentlich schwächer exprimiert wird. Die Expression der 18 kDa Isoform verändert sich durch Zugabe der einzelnen Substanzen nicht. In der Kern-Fraktion führt eine Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA zu einer leichten Abnahme der Bandenstärke und eine Behandlung mit 3 nM Testosteron zu einer leichten Zunahme der Bandenstärke.

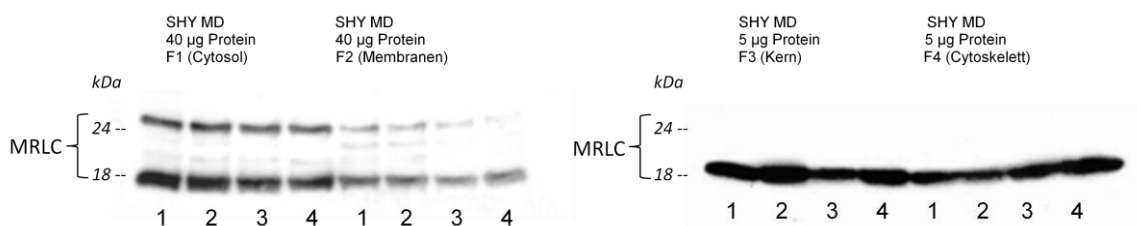


Bild 26: Nachweis der regulatorischen leichten Ketten von Myosin II (MRLCs) in mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen verschiedener Fraktionen in Abhängigkeit von der 30 minütigen Stimulation mit verschiedenen Substanzen. **(1)** 0,1% EtOH; **(2)** 3 nM Testosteron; **(3)** 30 nM DHEA; **(4)** 10 μ M Y-27632

Y-27632 induziert weder eine Ab- oder Zunahme der Bandenstärke im Vergleich zur Kontrolle. In der Cytoskelett-Fraktion kann eine deutliche Abnahme der Bandenstärke nach Stimulation der Zellen mit 3 nM Testosteron beobachtet werden und eine leichte Zunahme nach Behandlung mit 30 nM DHEA und 10 μ M Y-27632.

Die Untersuchungen an hochdifferenzierten Zellen ergeben, dass es in diesem Stadium zur Expression einer dritten MRLC-Isoform (22 kDa) kommt. In mitteldifferenzierten Zellen ist diese Isoform in der Membran-Fraktion bei Kontrollzellen und Testosteron-stimulierten Zellen schon schwach zu erkennen. In hochdifferenzierten Zellen wird sie dann sowohl in der Cytosol- als auch in der Membran-Fraktion exprimiert. Bei Kontrollzellen ist die 22 kDa Isoform in der Cytosol-Fraktion nur sehr schwach zu erkennen. In der Membran-Fraktion werden alle drei Isoformen gleich stark exprimiert. Auch in diesem Differenzierungsstadium werden in der Kern- und Cytoskelett-Fraktion nur die 18 kDa Isoform exprimiert. In diesen Fraktionen zeigt sich dann eine deutliche Abhängigkeit der Bandenstärke von der jeweiligen Stimulation der Zellen. Da diese Isoform sowohl in der Kern- als auch in der Cytoskelett-Fraktion in diesem Differenzierungsstadium sehr stark exprimiert wird, wurden hier jeweils nur 3 μ g Protein aufgetragen, um die Unterschiede deutlicher zu erkennen. Die Stimulation

der Zellen mit 3 nM Testosteron und 10 μ M Y-27632 führt zu einer erheblichen Steigerung der Bandenstärke in der Kern-Fraktion, die Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA hingegen zu einer deutlichen Abnahme der Bandenstärke. In der Cytoskelett-Fraktion kann die 18 kDa Isoform bei einer aufgetragenen Proteinmenge von 3 μ g in Kontrollzellen nicht mehr detektiert werden.

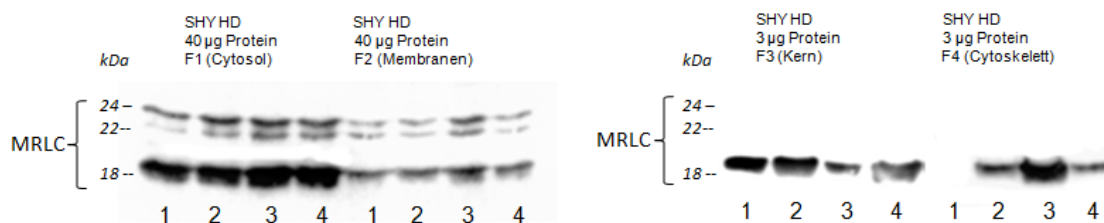


Bild 27: Nachweis der regulatorischen leichten Ketten von Myosin II (MRLCs) in ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen verschiedener Fraktionen in Abhängigkeit von der 30 minütigen Stimulation mit verschiedenen Substanzen. **(1)** 0,1% EtOH; **(2)** 3 nM Testosteron; **(3)** 30 nM DHEA; **(4)** 10 μ M Y-27632

Durch die Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA kommt es in dieser Fraktion zu einer erheblichen Zunahme der Bandenstärke im Vergleich zu Testosteron oder Y-27632 behandelten Zellen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es nach der Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA zu einer veränderten Lokalisation der 18 kDa Isoform vom Kern in den Bereich des Cytoskeletts kommt. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung der Zellen mit 3 nM Testosteron und 10 μ M Y-27632 scheinbar zu einer Umlokalisation dieser Isoform vom Cytoskelett in den Bereich des Kerns.

3.6 Lokalisation der MRLCs in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums und der Stimulation mit DHEA und Testosteron mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die mittels Western-Blot erhaltenen Ergebnisse konnten durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem auch für die Western-Blots verwendeten Antikörper wurde zur Darstellung aller drei Isoformen verwendet. Die Methode der Immunfluoreszenzfärbung kann also keine Information über die Lokalisation der einzelnen Isoformen innerhalb der Zelle geben, sondern nur eine Gesamtübersicht über die Lokalisation aller MRLCs. Auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnten die MRLCs in undifferenzierten Zellen jedesmal im Kern nachgewiesen werden.

Die Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen zeigt in diesem Differenzierungsstadium keinerlei signifikante Unterschiede in der Lokalisation der MRLCs. Bei allen Stimulationen und auch bei den Kontrollen konnten die MRLCs auch im Kern detektiert werden (**Bild 28**). Diese Ergebnisse bestätigen nochmals die mittels Western-Blot gewonnenen Ergebnisse, die ebenfalls die Lokalisation der MRLCs im Kern zeigen. Nach der

Stimulation der undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen mit 30 nM DHEA und 10 μ M LPA sind auch hier die durch Aktin gebildeten Stressfasern deutlich zu erkennen.

Colokalisationsexperimente durch eine Kombifärbung von Aktin (grün) und den MRLCs (rot) zeigen deutlich die Verteilung der MRLCs nach den jeweiligen Stimulationen (**Bild 29**). Bei den Kontrollzellen sind die MRLCs im Cytoplasma meist in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert. Nach der Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA und 10 μ M LPA kann eine Colokalisation der MRLCs mit den durch Aktin gebildeten Stressfasern beobachtet werden. Dabei verteilen sich die MRLCs hauptsächlich entlang der Stressfasern bis hin zur Plasmamembran.

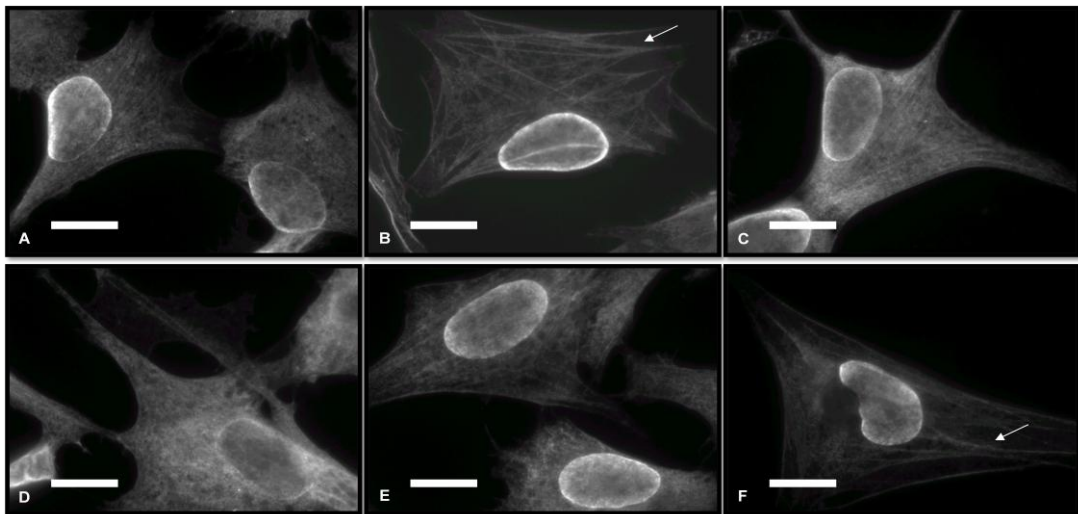


Bild 28: Immunfluoreszenzfärbung der MRLCs in undifferenzierten SH-SY5Y (1000x). **(A)** 30 min 0,1% EtOH; **(B)** 30 min 30 nM DHEA, Pfeil zeigt auf Lokalisation der MRLCs entlang der Stressfasern; **(C)** 30 min 3 nM Testosteron; **(D)** 30 min 10 μ M Y-27632; **(E)** 30 min 1 μ M Bradykinin; **(F)** 30 min 10 μ M LPA, Pfeil zeigt auf Lokalisation der MRLCs entlang der Stressfasern. Balken: 10 μ m

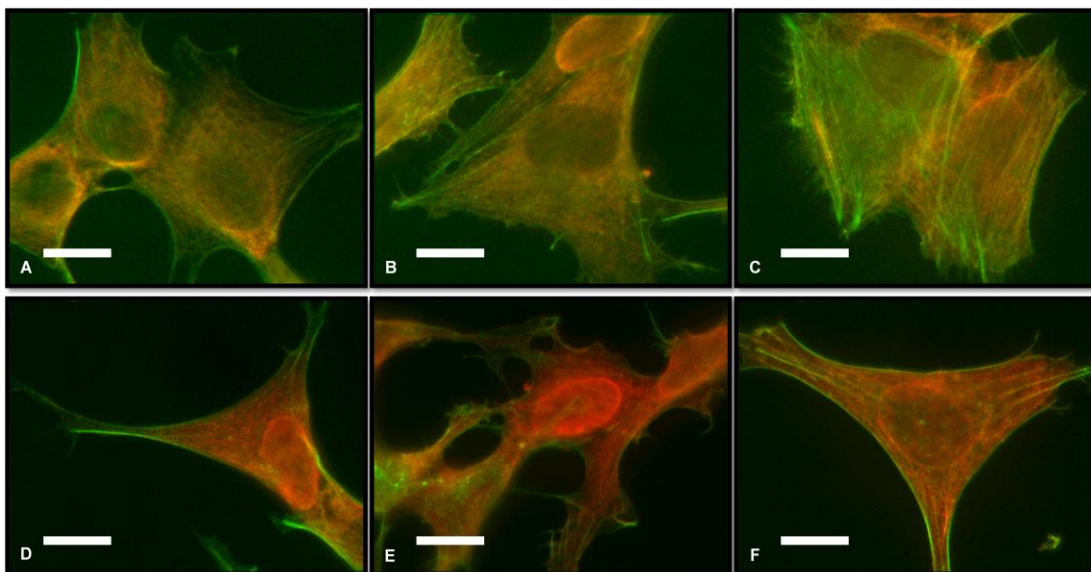


Bild 29: Doppelfärbung von Aktin (grün) und MRLC (rot) in undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen (1000x). **(A)** 30 min 0,1% EtOH; **(B)** 30 min 30 nM DHEA; **(C)** 30 min 10 μ M LPA; **(D)** 30 min 3 nM Testosteron; **(E)** 30 min 10 μ M Y-27632; **(F)** 30 min 1 μ M Bradykinin. Balken: 10 μ m

Die Stimulation der Zellen mit 3 nM Testosteron, 10 μ M Y-27632 und 1 μ M Bradykinin führen, wie bereits beschrieben, zu einem Verlust an Stressfasern. Wie in den Bildern gut zu erkennen ist, kommt es in diesen Fällen zu keiner Colokalisation der MRLCs mit Aktin. Dennoch ist hier eine gleichmäßige Verteilung der MRLCs im gesamten Cytoplasma bis hin zur Plasmamembran und den Lamellipodien zu beobachten.

Bei mitteldifferenzierten Zellen verändert sich die Verteilung der MRLCs nach der Stimulation der Zellen mit den jeweiligen Substanzen deutlich. Während bei den Kontrollzellen die MRLCs gleichmäßig im Cytoplasma verteilt sind, kommt es nach der Stimulation der Zellen mit 3 nM Testosteron zu einer deutlich veränderten Lokalisation der MRLCs zum Zellkern hin. Hierbei ist die Fluoreszenz in der Peripherie und im Zellkern selbst sehr stark ausgeprägt. Die Fluoreszenz in den Neuriten und Lamellipodien ist dagegen sehr schwach. Bei 1000 facher Vergrößerung ist im Bereich der Lamellipodien an der äußeren Plasmamembran ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenz zu erkennen. Diese Beobachtungen können auch nach der Stimulation der Zellen mit dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 gemacht werden. Auch hier wird im Bereich des Zellkerns eine erhöhte Fluoreszenz sichtbar.

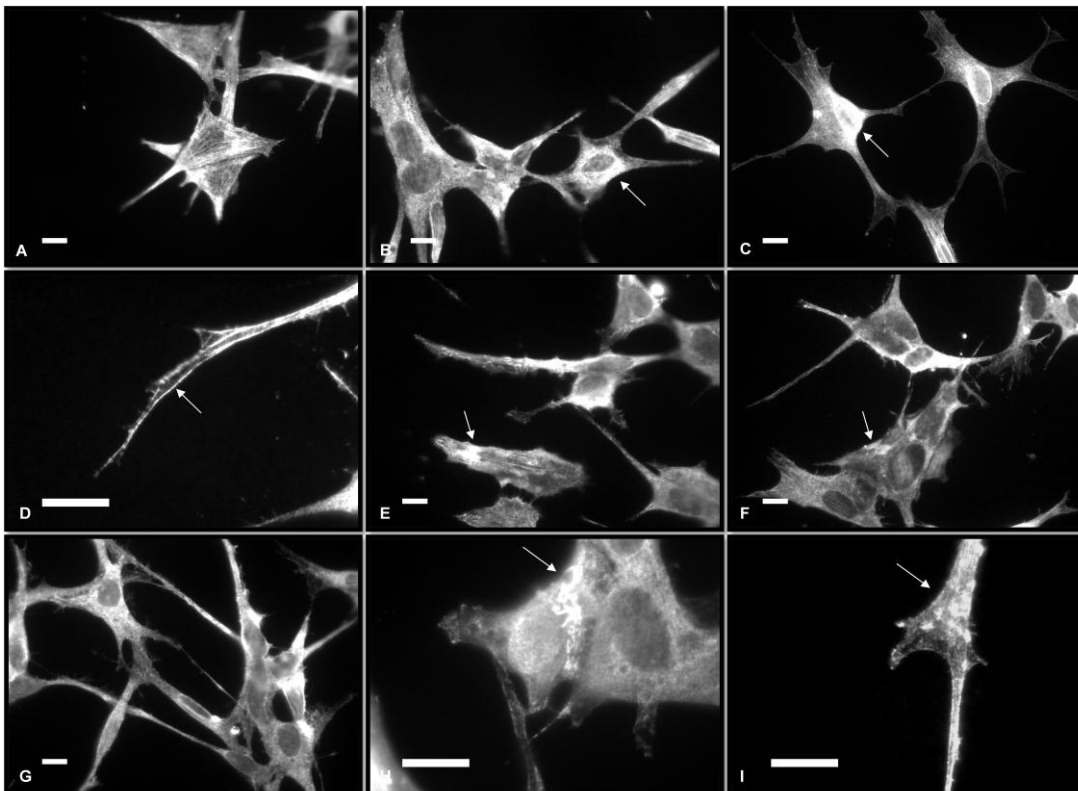


Bild 30: Immunfluoreszenzfärbung der MRLCs in mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. (A) 30 min 0,1% EtOH; (B)-(D) 30 min 3 nM Testosteron, Pfeile in (B) und (C) zeigen auf vermehrte Lokalisation im Zellkern und in der Peripherie des Zellkerns, Pfeil in (D) zeigt auf erhöhte Fluoreszenz im Bereich der Plasmamembran an den Enden der Neuriten; (E)+(F) 30 min 30 nM DHEA, Pfeile deuten auf Lokalisierung und Akkumulation der MRLCs in der kortikalen Region der Zellen; (G)-(I) 30 min 10 μ M Y-27632, Pfeile in (H) und (I) zeigen auf Akkumulation der MRLCs in der Peripherie des Zellkerns (H) und punktförmige Akkumulation an den Enden der Neuriten (I). Balken: 10 μ m

Im Bereich der Neuriten und der Zell-Zell-Kontakte kommt es ebenfalls zu einer erhöhten Fluoreszenz. Dabei ist eine punktförmige Akkumulation der MRLCs in diesen Bereichen zu

sehen. Die Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns nimmt nach der Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA deutlich ab. Hier kommt es im Bereich des Cytoplasmas in der Peripherie der Zellen zu einer Akkumulation der MRLCs. Diese Akkumulation findet meist nur auf einer Zellseite statt.

Die veränderte Lokalisation der MRLCs wird im hochdifferenzierten Stadium noch deutlicher. Die Verteilung der MRLCs in Kontrollzellen erstreckt sich auch in diesem Differenzierungsstadium durch das gesamte Cytoplasma und den Zellkern und ist regelmäßig.

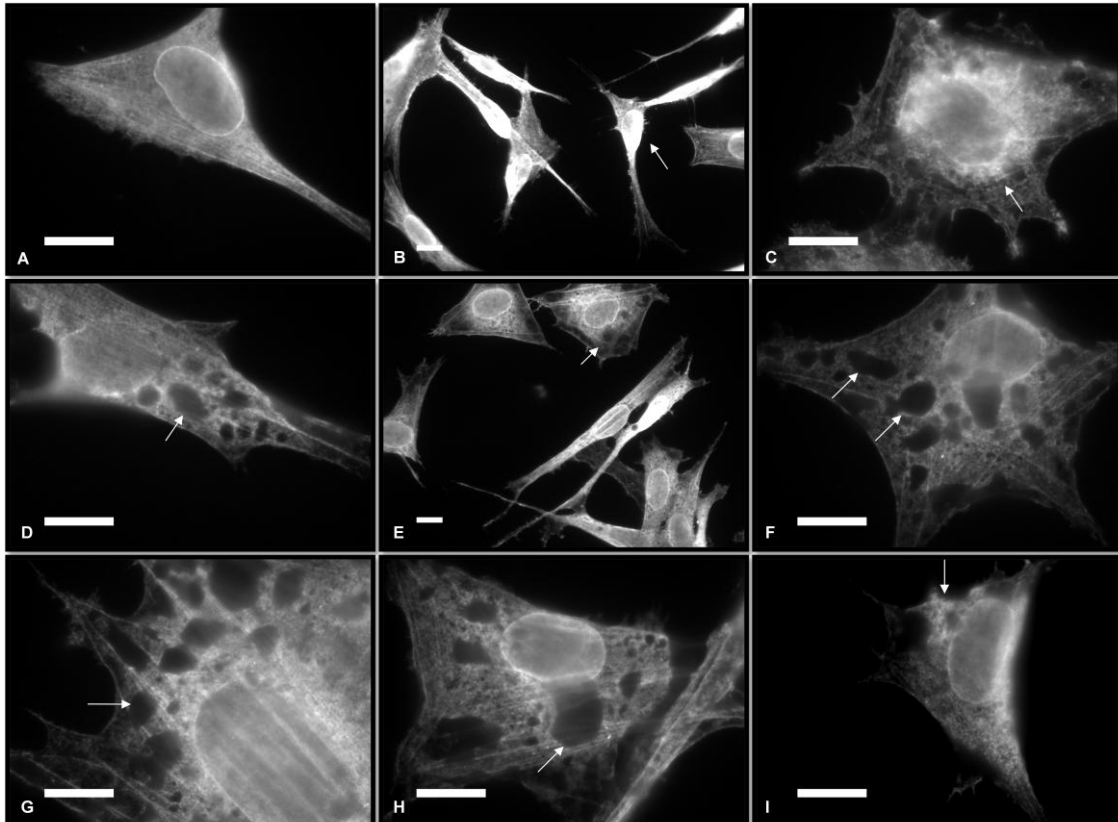


Bild 31: Immunfluoreszenzfärbung der MRLCs in hochdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. (A) 30 min 0,1% EtOH; (B)-(D) 30 min 3 nM Testosteron, Pfeil in (B) zeigt auf die extreme Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns; Pfeil in (C) zeigt bei 1000x Vergrößerung auch eine Akkumulation der MRLCs in der Peripherie des Zellkerns; Pfeil in (D) zeigt auf vesikuläre Strukturen ohne Fluoreszenz im Cytoplasma, hier sind keinerlei MRLCs lokalisiert; (E)-(H) 30 min 10 μ M Y-27632; in (E) sind sowohl die erhöhte Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns als auch die Ausbildung der vesikulären, fluoreszenzarmen Strukturen (Pfeil) zu erkennen; Pfeile in (F)-(H) zeigen diese Strukturen bei 1000x Vergrößerung; (I) 30 min 30 nM DHEA, Pfeil zeigt auf Akkumulation der MRLCs im kortikalen Bereich der Zelle. Balken: 10 μ m

Bei der Behandlung der Zellen mit 3 nM Testosteron ist eine extreme Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns zu beobachten. Bei 1000 facher Vergrößerung ist deutlich zu sehen, dass die MRLCs im Zellkern und in der unmittelbaren Peripherie des Zellkerns lokalisiert sind. Im Cytoplasma befinden sich in diesem Stadium große vesikuläre Strukturen, in denen keinerlei MRLCs lokalisiert sind. Auch bei Zellen, die mit 10 μ M Y-27632 behandelt wurden, treten diese Strukturen im Bereich des gesamten Cytoplasmas auf. Hier ist die Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns ebenfalls extrem hoch. Nach der Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA sind die MRLCs größtenteils im gesamten Cytoplasma lokalisiert. Dennoch finden

sich immer wieder Bereiche im Cytoplasma, in denen es zu einer flächigen Akkumulation der MRLCs kommt. Diese Akkumulation ist, wie auch schon bei mitteldifferenzierten Zellen zu beobachten war, meist auf eine Zellseite begrenzt. Die Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns nimmt nach der Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA mit steigender Differenzierung immer mehr ab.

Zusammenfassung von 3.5 und 3.6: Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels Western-Blot zeigen zum Ersten, dass SH-SY5Y-Zellen drei verschiedene Isoformen der regulatorischen leichten Kette des Myosins exprimieren. Diese Isoformen werden in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums verschieden stark exprimiert. Mit steigender Differenzierung verstärkt sich die Expressionsrate der 22 kDa Isoform und der 24 kDa Isoform. Die 18 kDa Isoform wird in allen Differenzierungsstadien weitgehend gleich stark exprimiert. Ebenso wird die 18 kDa Isoform in allen Kompartimenten der Zelle exprimiert. Im Gegensatz dazu beschränkt sich die Expression der 22 kDa Isoform und der 24 kDa Isoform auf den Bereich des Cytosols und der Membranen und Organellen.

Im hochdifferenzierten Stadium verändert sich die Lokalisation der 18 kDa Isoform unter dem Einfluss von Testosteron und DHEA. Die Stimulation mit Testosteron und auch dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 führt zu einer Zunahme der 18 kDa Isoform im Kern und zu einer Abnahme dieser Isoform im Bereich des Cytoskeletts. Eine Umverteilung der beiden schwereren Isoformen kann unter dem Einfluss der Steroide nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation der Zellen mit DHEA zu einer Verminderung der 18 kDa Isoform im Bereich des Zellkerns und zu einer Zunahme dieser Isoform im Bereich des Cytoskeletts. Auch hier kann keine signifikante Veränderung der schwereren Isoformen unter dem Einfluss von DHEA beobachtet werden.

Besonders überraschend ist die Beobachtung, dass es zu einer Lokalisation einer Isoform, nämlich der 18 kDa Isoform, im Zellkern kam. Um eine Unspezifität des verwendeten Antikörpers auszuschließen, wurden verschiedene Markerproteine untersucht. Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass die einzelnen Fraktionen sauber waren und eine unspezifische Bindung des Antikörpers ausgeschlossen werden kann. Die mittels Immunfluoreszenz erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der Westernblots. In allen Differenzierungsstadien werden MRLCs im Kern detektiert. Des Weiteren kommt es zu einer Zunahme der Expressionsrate der MRLCs mit steigender Differenzierung, die sich in einer gesteigerten Fluoreszenz bemerkbar macht. Während es im undifferenzierten Stadium zu keiner signifikanten Abhängigkeit der Verteilung von den eingesetzten Stimulanzen kommt, konnten im mitteldifferenzierten und hochdifferenzierten Stadium deutliche Effekte beobachtet werden. Die Stimulation der Zellen mit Testosteron und Y-27632 induziert eine Verminderung der gesamten MRLCs im Bereich des Cytoskeletts und eine Zunahme dieser im Bereich des Zellkerns. Im Gegensatz dazu kommt es nach Stimulation mit DHEA zu einer Abnahme der gesamten MRLCs im Bereich des Kerns und zu einer Zunahme der Isoformen im Bereich des Cytoskeletts. Da eine unmittelbare Expression und zusätzlich eine

Veränderung der Expressionsrate im Kern auszuschließen ist, muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beobachteten Effekten um Umlokalisationen handelt.

3.7 Charakterisierung der MRLCs durch DSS-Kopplung

Das Myosin-Molekül ist ein Hexamer, bestehend aus einem Paar schweren Ketten (M_r 200kDa) und zwei Paaren an leichten Ketten, der regulatorischen und der essentiellen leichten Kette (M_r 16-25kDa). Jeweils eine der leichten Ketten ist über eine nicht kovalente Bindung mit der globulären Domäne (S1) der schweren Kette verbunden (Kendrick-Jones). Um zu charakterisieren, in welcher Form die MRLCs in den einzelnen Fraktionen vorliegen, wurden die Zellen nach der Stimulation mit den jeweiligen Substanzen mit dem Kopplungsreagenz Disuccinimidyl Suberate (DSS) gekoppelt. Dieses Kopplungsreagenz koppelt Moleküle, die sich in einem Abstand von max. 11,4 Å befinden. Werden bei diesem Abstand Moleküle miteinander gekoppelt, kann man von einer direkten Interaktion bzw. Bindung ausgehen.

Nach der Kopplung der Proteine in undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen wurde eine Fraktionierung der Proteine in Cytosol-, Membran und Organellen-, Kern und Cytoskelett-Proteine durchgeführt. Die Darstellung der MRLCs erfolgte mittels Western Blot.

Die 18 kDa Isoform der MRLC ist in ihrer monomeren Form nur noch in der Kern- und Cytoskelett-Fraktion zu detektieren. In diesen Fraktionen kommt es auch zur Ausbildung von Dimeren der MRLC bei 36 kDa. Nach der Kopplung sind in der Membran und Organellen-Fraktion keine MRLCs mehr zu detektieren. Auch in der Cytosol-Fraktion ist die 18 kDa Isoform kaum noch detektierbar und es kommt hier auch nicht zur Ausbildung von Dimeren der MRLCs. Die 24 kDa Isoform ist in der Cytosol-Fraktion gut zu erkennen und liegt auch hier in ihrer monomeren Form vor. Diese Isoform bildet keine Dimere aus. Sowohl in der Cytosol- als auch in der Membran-Fraktion kann die 18 kDa Isoform nach der Kopplung in einem Größenbereich bis 250 kDa nicht mehr detektiert werden.



Bild 32: Nachweis der regulatorischen leichten Ketten von Myosin II (MRLCs) in undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen verschiedener Fraktionen, die mit dem Kopplungsreagenz DSS behandelt wurden. **(1)+(2)** Cytosol-Fraktion; **(3)+(4)** Membran- und Organellen-Fraktion; **(5)+(6)** Kern-Fraktion; **(7)+(8)** Cytoskelett-Fraktion; **(9)** Kern-Fraktion ohne Kopplung mit DSS (Kontrolle).

Dies läßt vermuten, dass es zu einer Kopplung der MRLC an Proteine oder Proteinkomplexe kommt, deren apparente Molekulargewichte weit über 250 kDa liegen und auch mit Hilfe einer 7,5 %igen SDS-PAGE nicht aufzutrennen sind.

3.8 Erhöhte Phosphorylierung an Ser19 der MRLC durch DHEA

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Aktinskeletts lassen den Schluß zu, dass es durch die Stimulation der Zellen mit DHEA zu einer Aktivierung des Rho-Signalwegs kommt. Ein direkter Effektor von Rho ist die Rho-Kinase, so dass eine Aktivierung von Rho ebenfalls zu einer Aktivierung der Rho-Kinase führt. Bei den wichtigsten Substraten von ROCK handelt es sich um die MRLCs (Amano, 1996) und die MBS (mysin binding subunit) der MLC-Phosphatase (Kawano, 1999), die eine Schlüsselrolle in der Filament Assemblierung spielen. Die MLC-Phosphatase wird durch Phosphorylierung inhibiert. Diese Inhibierung führt wiederum zu einer Erhöhung der MLC-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung der MRLC findet an Ser19 statt, wodurch sich die ATPase-Aktivität von Myosin II erhöht und die Assemblierung von Aktinomyosinfilamenten gefördert wird (Amano, 1996) (Kawano, 1999). In diesem Ergebnisteil soll nun gezeigt werden, dass eine Stimulation der Zellen mit DHEA zu einer erhöhten Phosphorylierung der MRLC an Ser19 führt und der Rho-Signalweg definitiv durch DHEA aktiviert wird. Der Nachweis der Phosphorylierung an Ser19 der MRLC erfolgte mittels Western Blot nach einer IP der regulatorischen leichten Ketten von Myosin II aus undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. Die Monophosphorylierung an Ser19 wurde mit einem Antikörper nachgewiesen (Anti-Phospho-Ser19), der spezifisch gegen eine Phosphorylierung an Ser19 der MRLC gerichtet ist.

Bei den Banden in Ansatz 7 (**Bild 33**) handelt es sich um Antikörper-Banden (kein Protein A, da in Ansatz 1 keine Banden vorhanden sind). Bei den beiden unteren Banden (rot umrandet) dürfte es sich um an Ser19 phosphorylierte MRLCs handeln. Dabei kann man davon ausgehen, dass es sich bei der oberen der beiden Banden um die monophosphorylierte und bei der unteren Bande um die diphosphorylierte Form handelt. Eine Diphosphorylierung findet an Threonin18 und Serin19 statt. Die monophosphorylierte, obere Bande ist nach LPA bzw. DHEA-Behandlung stärker als die der Kontrollen. Y-27632 hingegen reduziert die Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrollen nicht noch weiter, was bedeutet, dass bei den Kontrollen der Rho-Weg nicht aktiv war. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Stimulation eine erhöhte Phosphorylierung an Ser19 induziert.

Der Nachweis, dass auf jeder Spur die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde, erfolgte mittels Antikörpernachweis gegen die totalen MLCs. Da im Western-Blot der gleiche AK wie für die Phosphorylierung verwendet worden war, markiert der Zweitantikörper natürlich sehr stark die Antikörperbanden im Blot. In Spur 1 (**Bild 34**) sind nun Banden sichtbar, u. a. auf Höhe der oberen MLC-Bande (grün umrandet). Das bedeutet, dass sich auch ohne AK bei der IP geringe Mengen an MLC in der Probe befinden. Die MLC-Banden

der Kontrolle sind gleich stark wie die der LPA- bzw. DHEA-behandelten Zellen, d.h. LPA und DHEA induzieren tatsächlich eine Phosphorylierung der MLC an Ser19.

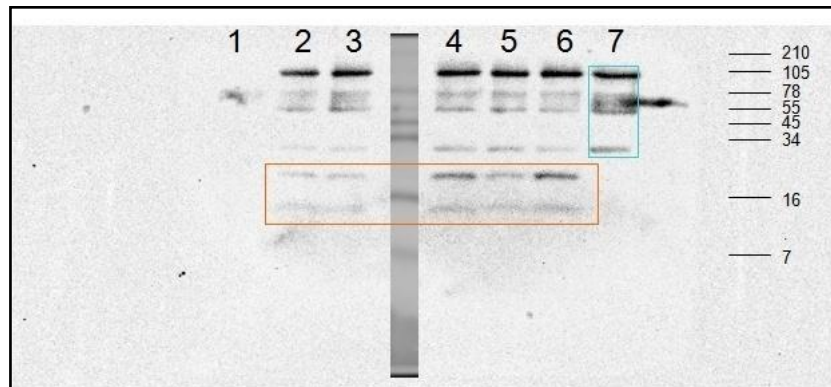


Bild 33: Nachweis der Phosphorylierung der MRLC an Ser19 nach einer IP von undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. (1) 30 min LPA 10 μ M (kein AK bei IP); (2) Medium-Kontrolle (kein Zusatz); (3) 30 min EtOH 0,1%; (4) 30 min LPA 10 μ M; (5) 30 min Y-27632 10 μ M; (6) 30 min DHEA 30 nM; (7) nur Sepharose mit Puffer und AK

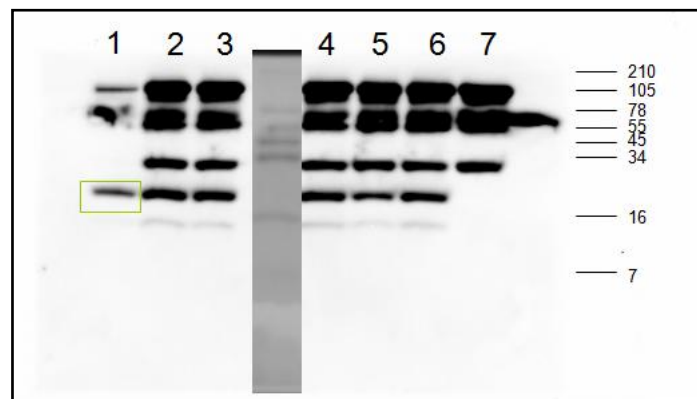


Bild 34: Nachweis der totalen MLCs nach der IP von undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. (1) 30 min LPA 10 μ M (kein AK bei IP); (2) Medium-Kontrolle (kein Zusatz); (3) 30 min EtOH 0,1%; (4) 30 min LPA 10 μ M; (5) 30 min Y-27632 10 μ M; (6) 30 min DHEA 30 nM; (7) nur Sepharose mit Puffer und AK

3.9 Synthese von fluoreszenzmarkierten DHEA- bzw. Testosteron-Derivaten

Das Ziel der Synthese eines fluoreszenzmarkierten Steroidhormonderivats war die Klärung der subzellulären Lokalisation und des Transports des jeweiligen Steroids.

Da von einem Eintritt der Steroide in die Zelle und einem weiteren subzellulären Transport ausgegangen werden musste, wurde ein Fluoreszenzfarbstoff mit möglichst hydrophoben Eigenschaften gewählt. Zusätzlich war darauf zu achten, dass der Farbstoff möglichst weit von den funktionalen Gruppen der Steroide entfernt ist, um die Funktionalität des Steroids und der betroffenen Seitengruppen nicht zu inhibieren. Daher wurde ein Farbstoff mit einem langen „Spacer“ ausgewählt. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl des verwendeten Farbstoffes war das Absorptionsspektrum des Farbstoffes. Zum einen war darauf zu achten, dass die Anregungswellenlänge nicht im oder nahe des UV-Bereichs liegt, um eine Schädigung der Zellen bei einer Lebendmikroskopie zu vermeiden. Zum anderen war darauf zu achten, dass das Fenster des Absorptionsspektrums möglichst eng ist, d.h. dass

Absorption und Emission des Farbstoffs nahe zusammenliegen. Diese Eigenschaften werden besonders bei Kollokalisationsstudien mit anderen Markern für intrazelluläre Kompartimente wichtig. Hier ist dann darauf zu achten, dass sich das Absorptionsspektrum und das Emissionsspektrum zweier Farbstoffe nicht überlagern.

Die Fluoreszenzmarkierungen von DHEA und Testosteron erfolgten über sogenannte „Pseudopeptidbindungen“ nach der Synthesevorschrift unter 2.9. Im Folgenden sind die jeweiligen Reaktionsgleichungen für DHEA bzw. Testosteron nochmal dargestellt.

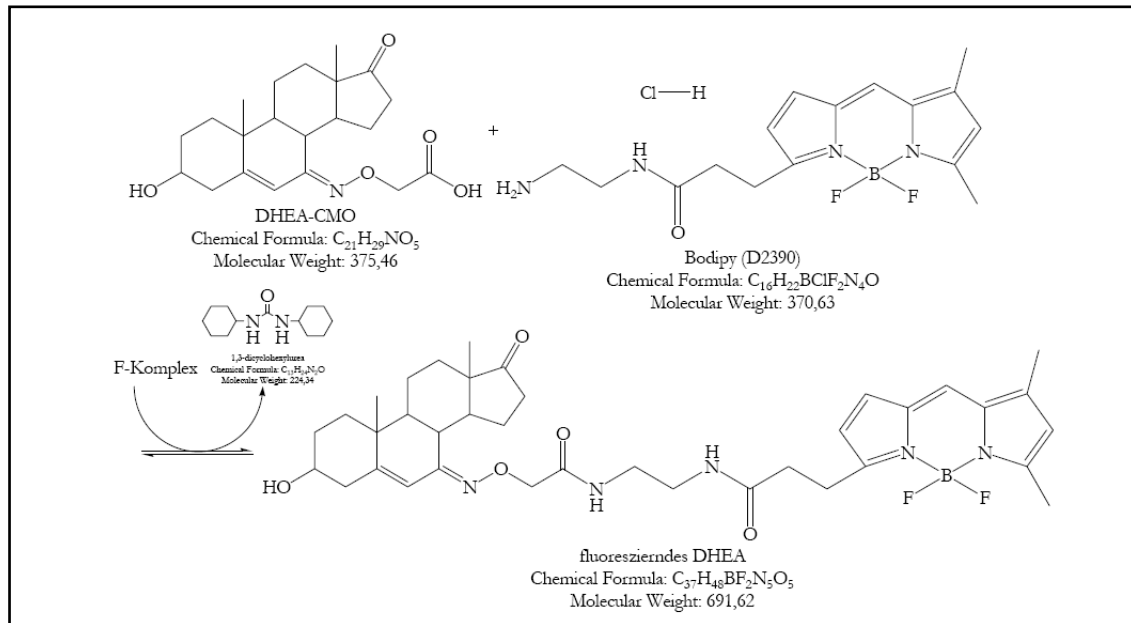


Abbildung 34: Reaktionsgleichung der Synthese von DHEA-Bodipy

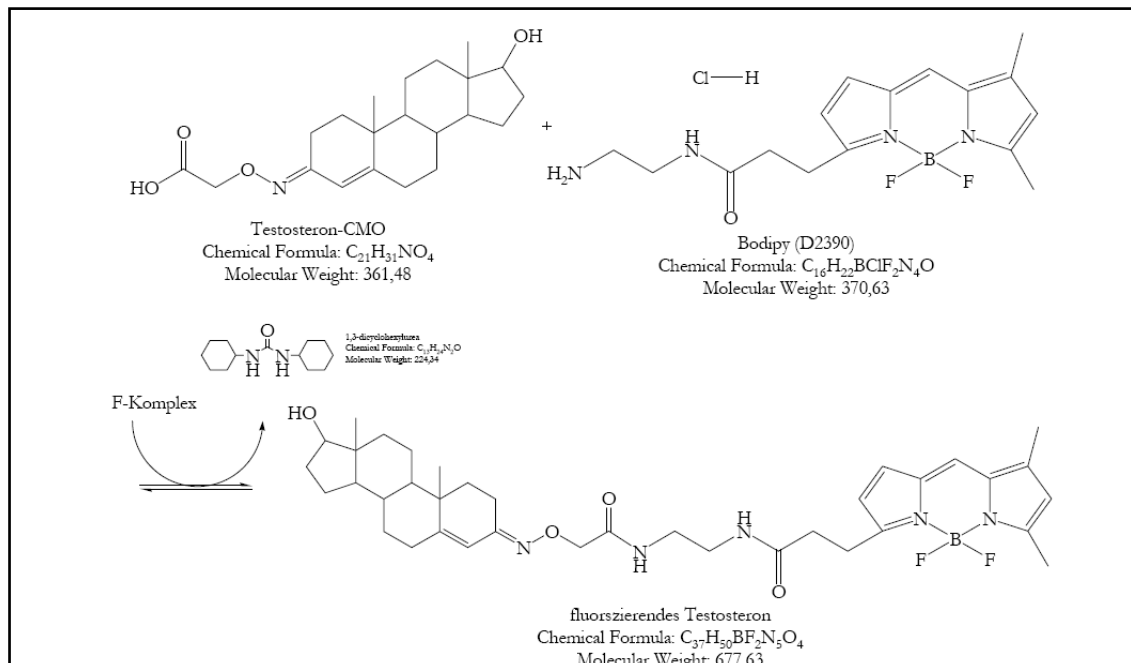


Abbildung 35: Reaktionsgleichung der Synthese von Testosteron-Bodipy

3.9.1 Bestimmung der Umsetzung des Reaktionsansatzes mittels Dünnschichtchromatographie

3.9.1.1 Bestimmung der vollständigen Reaktionsdauer

Die Überprüfung der verschiedenen Substanzen im Reaktionsgemisch erfolgte mittels DC. Die beste Auftrennung der Substanzen erfolgte durch das relativ polare Laufmittelgemisch Benzol/Ethylacetat/Aceton im Verhältnis 1:8:1. Der Nachweis der Steroide erfolgte in der Jodkammer, wobei sich die Steroide gelb anfärbten. Der Fluoreszenzfarbstoff färbte sich in der Jodkammer rot an und konnte zusätzlich unter UV-Licht als fluoreszierender Spot detektiert werden.

Die Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten ergab, dass es erst nach 72h bei Raumtemperatur zu einer vollständigen Umsetzung und zur Bildung des Pseudopeptids DHEA-Bodipy bzw. Testosteron-Bodipy kommt. Während die Umsetzung von DHEA-CMO zu DHEA-Bodipy zu einem eindeutigen Spot auf der DC führte, entstanden bei der Umsetzung von Testosteron-CMO zu Testosteron-Bodipy mehrere Spots.

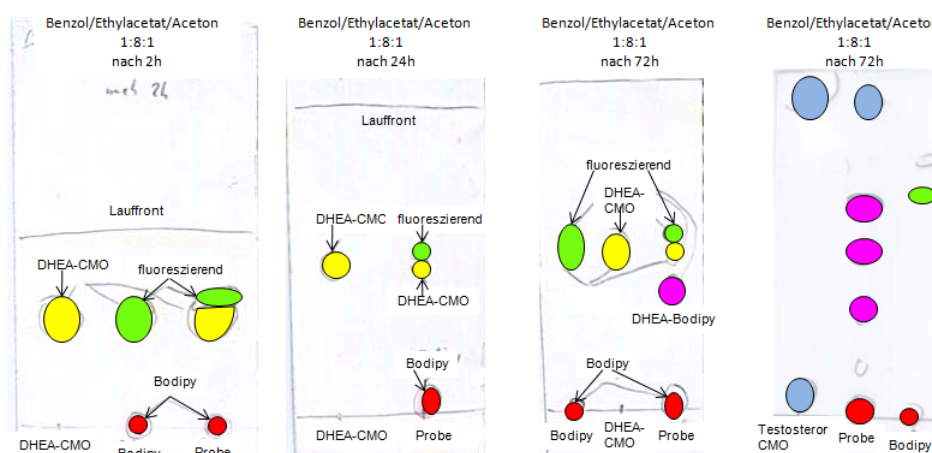


Bild 35: Bestimmung der Reaktionsdauer für die Umsetzung zu DHEA- bzw. Testosteron-Bodipy. Bild zeigt die einzelnen DCs mit den entnommenen Proben des Reaktionsgemisches nach 2h, 24h und 72h. Die Umsetzung von DHEA-CMO bzw. Testosteron-CMO zu DHEA- bzw. Testosteron-Bodipy erfolgt erst nach 72h.

3.9.1.2 Charakterisierung mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die mittels analytischer DC aufgetrennten Reaktionsgemische ergaben für DHEA-Bodipy und für Testosteron-Bodipy mehrere Spots auf der DC-Platte. Die Bestimmung, ob es sich bei einem dieser Spots um das gewünschte Produkt handelt, erfolgte mittels ESI-MS, wobei das Molekulargewicht bestimmt wurde (siehe 3.9.1.3). Dazu wurden die Proben mittels semipräparativer DC isoliert, aufgereinigt und anschließend mit dem geeigneten Lösungsmittel aus dem Kieselgel eluiert.

3.9.1.3 Bestimmung des geeigneten Lösungsmittels

DMF stellte ein geeignetes Lösungsmittel dar, da sich die Produkte aller Spots auf der DC gut darin lösten. Jedoch eignete sich DMF nicht zur Massenspektrometrie, da es einen niedrigen Dampfdruck besitzt und somit bei Raumtemperatur kaum flüchtig ist. Aus den getesteten Lösungsmitteln konnte neben DMF auch Ethanol als sehr gutes Lösungsmittel eingesetzt werden. Die verschiedenen Proben wurden nach Aufreinigung über die semipräparative DC mit Ethanol aus dem Kieselgel eluiert. Um zu kontrollieren, ob sich die Produkte gut in Ethanol lösten, wurden weitere analytische DCs durchgeführt und die Proben dann zur Molekulargewichtsbestimmung mittels ESI-MS gegeben.

Das durch ESI-MS erwartete Molekulargewicht des DHEA-CMO beträgt 691,62 g/mol. Im ESI-Spektrum zeigen sich mehrere Peaks, wobei es sich bei einem Peak von 714,37 g/mol um das gewünschte Produkt handelt (DHEA-Bodipy + Na⁺). Ein Na⁺-Ion hat eine Masse von 22,98 g/mol. Zieht man diese Masse von den ermittelten 714,37 g/mol ab, so erhält man eine Masse von 691,39 g/mol. Diese Masse entspricht dem gesuchten DHEA-Bodipy. Bei den nachfolgenden Peaks handelt es sich wahrscheinlich um NaCl-Cluster. In den anderen Spots ist das gewünschte Produkt DHEA-Bodipy nicht enthalten.

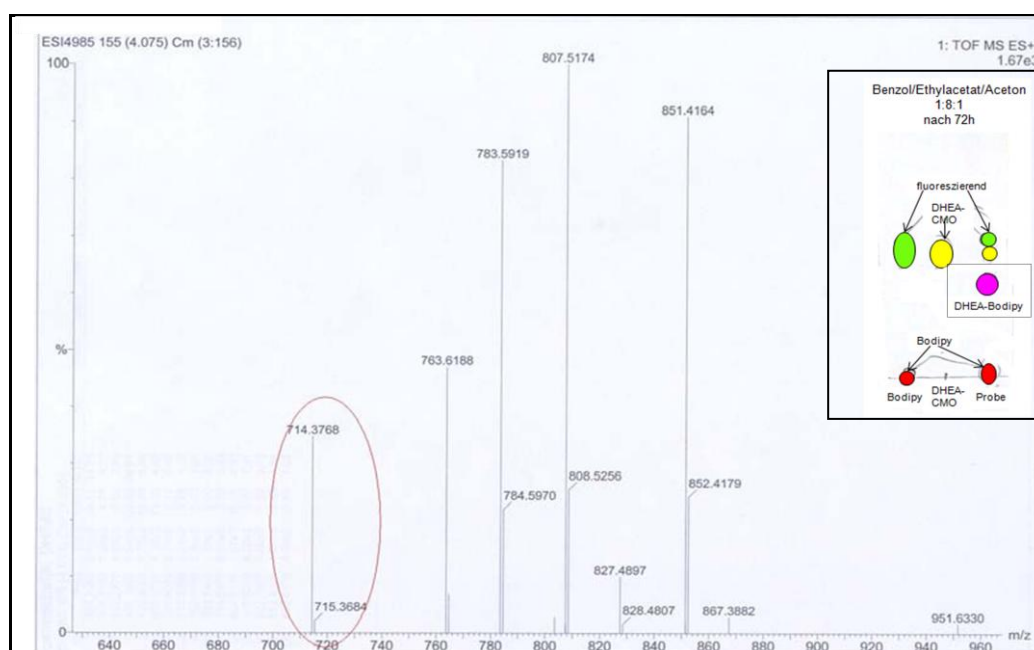


Bild 36: Massenspektrometrische Bestimmung des Molekulargewichts des entstandenen Synthese-Produkts DHEA-Bodipy. Details siehe Text.

Auch für Testosteron wurden drei in Frage kommende Proben gemessen. In zwei Proben wurde das gewünschte Produkt Testosteron-Bodipy detektiert. Die erwartete Masse von Testosteron-Bodipy beträgt 677,69 g/mol. In beiden positiven Proben wurde eine Masse von 700,41 detektiert, wobei auch hier ein mitfliegendes Na⁺-Ion mit einer Masse von 22,98 g/mol abzuziehen ist. Demnach erhält man eine Masse von 677,43. Dies entspricht somit dem gesuchten Produkt.

Da in zwei Spots mit unterschiedlichem Laufverhalten auf der DC das gewünschte Produkt Testosteron-Bodipy zu detektieren war, könnte es sich bei den beiden Produkten um Isoformen des fluoreszenzmarkierten Testosterons handeln. Dies kann damit begründet werden, dass Testosteron mehrere chirale Zentren besitzt.

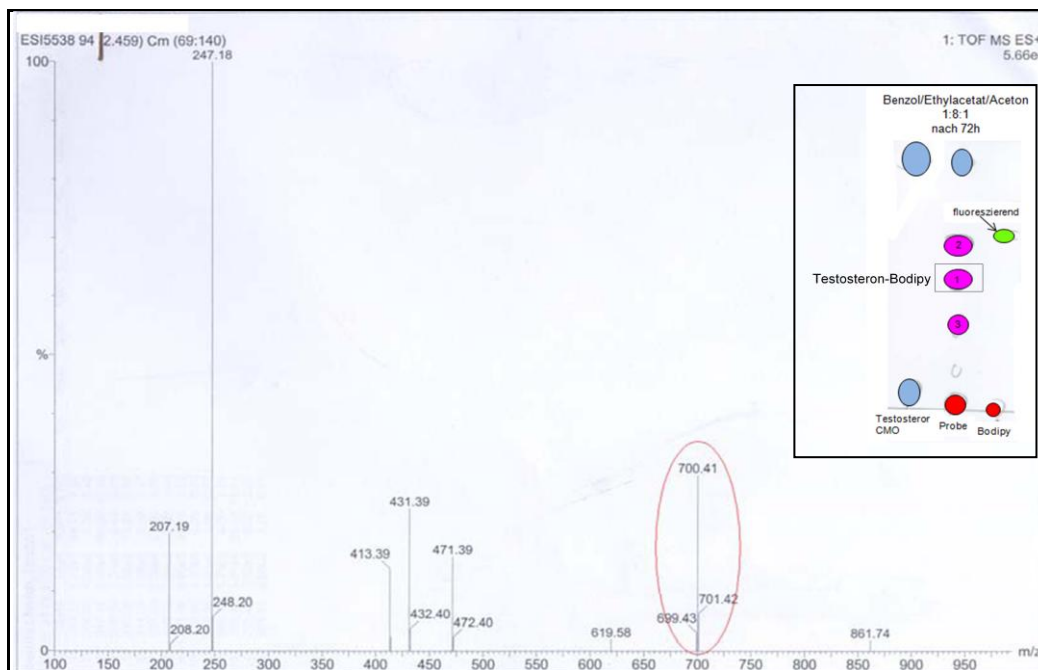


Bild 37: Massenspektrometrische Bestimmung des Molekulargewichts des entstandenen Synthese-Produkts Testosteron-Bodipy. Details siehe Text.

3.9.1.4 Aufreinigung und Bestimmung der Ausbeute

Die fluoreszierenden Steroidhormonderivate wurden, wie in 3.9.1.3 beschrieben, über eine semipräparative DC aufgereinigt und die entsprechenden Spots aus den Platten ausgekratzt und mittels Ethanol eluiert. Das in Ethanol unlösliche Kieselgel wurde durch mehrfaches Abfiltrieren aus dem Lösungsmittel entfernt. Um das Lösungsmittel aus den Proben zu entfernen, wurden sie am Rotationsverdampfer einrotiert. Nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels wurde die Ausbeute der fluoreszenzmarkierten Steroidhormon-Derivate bestimmt.

Steroid	Ausbeute in mg	Ausbeute in Mol	Ausbeute in %
DHEA-Bodipy	2 mg	2,89 μmol	71,15%
Testosteron-Bodipy	2,6 mg	3,84 μmol	94,83%

Zur Herstellung der jeweiligen 30 μM Stammlösung, wurden die beiden fluoreszierenden Steroide in dem entsprechenden Volumen 100% Ethanol aufgenommen.

3.10 Überprüfung der Funktionalität von DHEA-Bodipy

3.10.1 Aktivierung des Estrogen-Rezeptor α durch DHEA-Bodipy

Estrogen-Rezeptoren sind in der Zellmembran, in den Mitochondrien und im Zellkern lokalisiert. Einige Studien bestätigen, dass DHEA die Proliferationsrate von Estrogen-sensitiven Zellen erhöht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass DHEA und DHEA-S die Estrogen-Rezeptoren und die Estrogen-sensitive Proliferation in MCF7 Zellen aktivieren. In den Arbeiten von S.J.Webb wurden Luciferase-Reporter-Assays zur Quantifizierung der transkriptionellen Aktivierung der Estrogen-Rezeptoren α und β durch DHEA herangezogen. Es stellte sich heraus, dass DHEA den Estrogen-Rezeptor β in demselben Maße aktiviert wie 17β -Estradiol. Der Estrogen-Rezeptor α wurde durch DHEA schwächer aktiviert, diese Aktivierung konnte aber durch eine Steigerung der DHEA-Konzentration verbessert werden. DHEA-S konnte keine signifikante Aktivierung beider Estrogen-Rezeptoren bewirken (Webb, 2006). Um die Funktionalität des synthetisierten DHEA-Bodipy über eine Aktivierung des Estrogen-Rezeptor α zu überprüfen, wurden SK-ER α -Zellen, die den ER α stabil exprimieren, transient mit einem ERE-Luciferase-Reporter-Vektor transfiziert. Die Menge an Luciferase wurde anhand der emittierten Chemilumineszenz bestimmt.

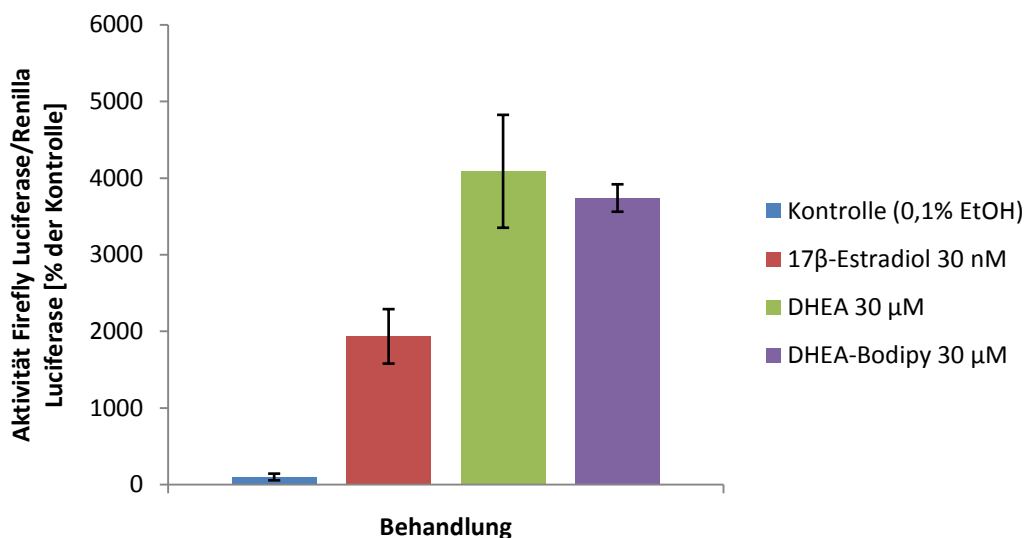


Diagramm 3: Stimulationsversuch zur transkriptionellen Aktivierung des ER α durch DHEA und DHEA-Bodipy in SK-ER α -Zellen. SK-ER α -Zellen wurden mit dem ER-Luciferase-Reporter-Vektor bzw. dem Renilla-Luciferase-Reporter-Vektor transient cotransfiziert. 20 Stunden nach der Transfektion wurden die zu testenden Substanzen in DMEM mit 1% P/S und 10% charcoal stripped FCS zu den Zellen gegeben und 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität bestimmt.

Die Stimulation der Zellen mit 17β -Estradiol führt zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung des ER-Luciferase-Reporterkonstrukts um das 20fache. DHEA induziert eine Aktivitätssteigerung um das 40fache. Die Behandlung mit DHEA-Bodipy führt mit einer Aktivitätssteigerung um das 38fache zu einem ähnlich starken Effekt wie die Behandlung mit DHEA. Dies bestätigt, dass das fluoreszierende Steroidhormonderivat DHEA-Bodipy im

Luciferase-Reporter-Assay die gleiche Funktionalität aufweist wie DHEA.

3.10.2 Antiapoptotischer Effekt von DHEA-Bodipy

Die Neurosteroiden DHEA, DHEA-S und Allopregnanolon schützen PC12 Zellen vor Apoptose, die durch Serumentzug induziert wird. Dieser antiapoptotische Effekt wird über das antiapoptotische Bcl-2 Protein verursacht. Alle drei der oben genannten Steroide induzieren die Expression des Bcl-2 und des Bcl-xL Proteins. DHEA und Allopregnanolon modulieren die Genexpression des Bcl-2 Proteins sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslativeller Ebene und aktivieren die antiapoptotischen Transkriptionsfaktoren CREB und NF- κ B und die PKC α β -Kinase (Charalampopoulos, 2004). Dieses Modellsystem wurde für einen zweiten Funktionalitätstest des synthetisierten DHEA-Bodipy herangezogen, da er eine hohe Spezifität aufweist. Die antiapoptotischen Effekte von DHEA(S) und Allopregnanolon erwiesen sich als strukturspezifisch. Neben den genannten Steroiden wurden eine Reihe weiterer Struktur-ähnlicher Steroide getestet. 3 α -OH und 3-Keto, Δ^4 (Doppelbindung zwischen C4-C5) Konformationen waren inaktiv. Δ^4 -3-Keto Steroide wie Testosteron, Progesteron, Kortikosteron, 4-Androsten-3 β -ol-17-on, 5-Androstan-3 α -ol-17-on und 5-Androsten-3,17-dion wiesen keine antiapoptotischen Effekte nach Serumentzug in PC12 Zellen auf. Eine Hydroxygruppe an C7 (7 α -Hydroxy-DHEA, 7 β -Hydroxy-DHEA) oder C17 führte ebenfalls zu einem Verlust der antiapoptotischen Eigenschaften. Auch bei den Pregnanen zeigte sich, dass die 3 α -OH Gruppe eine wichtige Rolle spielt, da die 3 β -OH Analoge von Alloprenanolon und Epi-Allopregnanolon unwirksam waren (Charalampopoulos, 2004).

Bei dem von mir synthetisierten DHEA-Bodipy wurde der Farbstoff an C7 angehängt. Da diese Position für den antiapoptotischen Effekt eine kritische Rolle spielt, sollte nun getestet werden, ob die Modifikation an C7 des synthetisierten DHEA-Bodipy zu einem Verlust der antiapoptotischen Eigenschaften führt.

Um die Apoptose in PC12 Zellen einzuleiten, wurde den Zellen 24h vor Stimulation mit den einzelnen Steroiden das Serum entzogen. Als Negativkontrollen dienten Zellen ohne Serumentzug, als Positivkontrollen dienten Zellen, denen entweder 24h das Serum entzogen oder die Apoptose durch Zugabe von H₂O₂ induziert wurde.

Die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen nach den einzelnen Behandlungen erfolgte quantitativ mittels des APOPercentage®-Assays durch Absorptionsmessung und zusätzlich durch Auflichtmikroskopie an den noch lebenden PC12 Zellen.

Die Apoptoserate nach der Behandlung der PC12 Zellen mit 1mM H₂O₂ ergibt einen Absorptionswert bei 550 nm von 0,328. Dieser Absorptionswert entspricht einer Apoptoserate von 100%. PC12 Zellen weisen nach 24h Serumentzug eine Apoptoserate von ca. 65% auf. Als Kontrollen dienten Versuchsansätze, in denen die Zellen mit den jeweiligen Lösungsmitteln behandelt wurden, um einen Effekt dieser Substanzen auf die Apoptoserate ausschließen zu können.

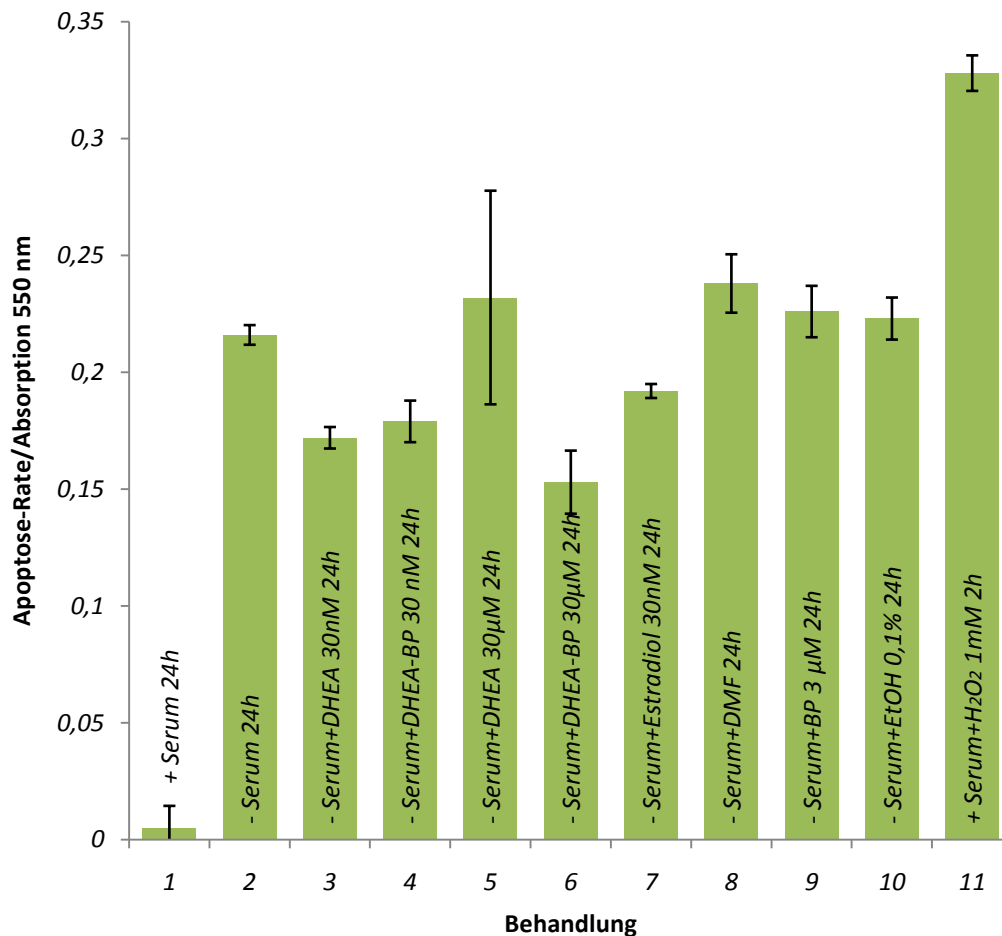


Diagramm 4: Apoptose-Assay in PC 12-Zellen. Der Apoptose-Assay wurde an PC-12 Zellen in 24-Well Schalen durchgeführt. Es wurden 60000 Zellen pro Well ausgesät und 24h in Serum-haltigem RPMI-Medium kultiviert. Danach erfolgte die Stimulation mit den jeweiligen Substanzen. Zur Apoptose-Induktion wurde den Zellen das Serum für 24h entzogen bzw. als Positivkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit H₂O₂ für 2h in Serum-haltigem Medium. Die entsprechende Steroid-/Substanz-Behandlung wurde unter Serum-freien Bedingungen für 24h durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde den Zellen der Apoptose-Farbstoff zugesetzt und 30 min inkubiert. Zur Ermittlung der Apoptoserate mittels Absorptionsmessung wurden die Zellen mit eingelagertem Farbstoff mit einem „Dye release reagent“ behandelt. Die Apoptoserate wurde dann mittels der Absorption des Farbstoffs bei 550 nm ermittelt.

Die Stimulation nur mit 0,1% DMF (Lösungsmittel des Farbstoffs), mit 3 µM Bodipy (nur Farbstoff) und 0,1% EtOH (Lösungsmittel der Steroide und des DHEA-Bodipy) führen zu keiner Senkung der Apoptoserate (Apoptoserate 68-72%).

Ein toxischer Effekt dieser Lösungsmittel kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da es auch zu keiner signifikanten Erhöhung der Apoptoserate kommt.

Die Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA während des Serumentzugs, kann die Apoptoserate signifikant auf 52% senken. Ebenso führt eine Stimulation mit 30 nM DHEA-Bodipy während des Serumentzugs zu einer Senkung der Apoptoserate auf 54%. Dieser Wert entspricht dem durch 30 nM DHEA erhaltenen Wert und zeigt, dass das synthetisierte DHEA-Derivat hinsichtlich der Senkung der Apoptoserate bei PC12 Zellen funktional ist. Die Apoptoserate bei Serumentzug kann durch die Stimulation mit 30 nM 17β-Estradiol auf ca. 58% gesenkt werden. Überraschenderweise führt die Stimulation der Zellen mit 30 µM DHEA zu keiner Verminderung der Apoptoserate nach Serumentzug. Durch eine Erhöhung

der Konzentration des DHEA-Bodipy auf 30 μM kann eine zusätzliche Senkung der Apoptoserate auf ca. 46% erzielt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch Serumentzug induzierte Apoptose durch Stimulation mit DHEA signifikant reduziert wird. Das synthetisierte Steroidhormonderivat, DHEA-Bodipy, induziert eine ähnlich signifikant reduzierte Apoptoserate. Die Modifizierung mit dem hydrophoben Farbstoff an C7 beeinflusst nicht die antiapoptotischen Effekte und führt somit nicht zu einem Verlust der Funktionalität.

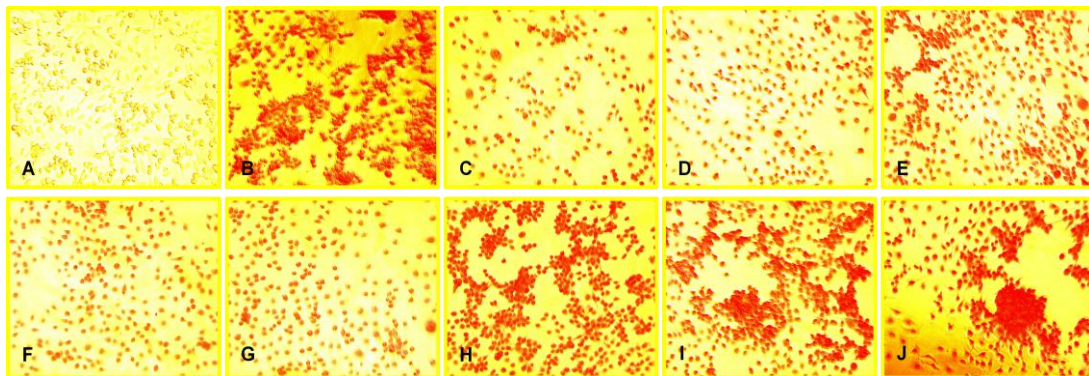


Bild 38: Auflichtmikroskopie in Echtfarben von PC12-Zellen. Apoptotische Zellen wurden durch den APOPercentage®-Farbstoff rot angefärbt. **(A)** + Serum 24h; **(B)** – Serum 24h; **(C)** – Serum + DHEA 30 nM 24h; **(D)** – Serum + DHEA-Bodipy 30 nM 24h; **(E)** – Serum + DHEA 30 μM 24h; **(F)** – Serum + DHEA-Bodipy 30 μM 24h; **(G)** – Serum + 17 β -Estradiol 30 nM 24h; **(H)** – Serum + DMF 24h; **(I)** – Serum + Bodipy 3 μM 24h; **(J)** – Serum + EtOH 0,1% 24h

3.10.3 Induktion von Filopodien, Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen durch DHEA-Bodipy

Wie in den Abschnitten von 3.4 beschrieben, führt eine Behandlung mit DHEA zur Ausbildung von Filopodien, zahlreichen Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen in SH-SY5Y-Zellen über eine Induktion des Rho-Signalwegs. In den folgenden Untersuchungen sollte nun überprüft werden, ob auch eine Stimulation mit dem Steroidhormonderivat DHEA-Bodipy zur Bildung von Filopodien, vermehrten Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen führt.

Die Stimulation mitteldifferenzierter Zellen mit DHEA-Bodipy zeigt, dass es auch unter Einfluss des Steroidhormonderivats zur Ausbildung von Filopodien und zahlreichen Stressfasern kommt, und dass die Ausbildung dieser Charakteristika mit denen von DHEA identisch ist. Diese Effekte können sowohl bei einer Konzentration von 30 nM als auch bei einer Konzentration von 30 μM beobachtet werden.

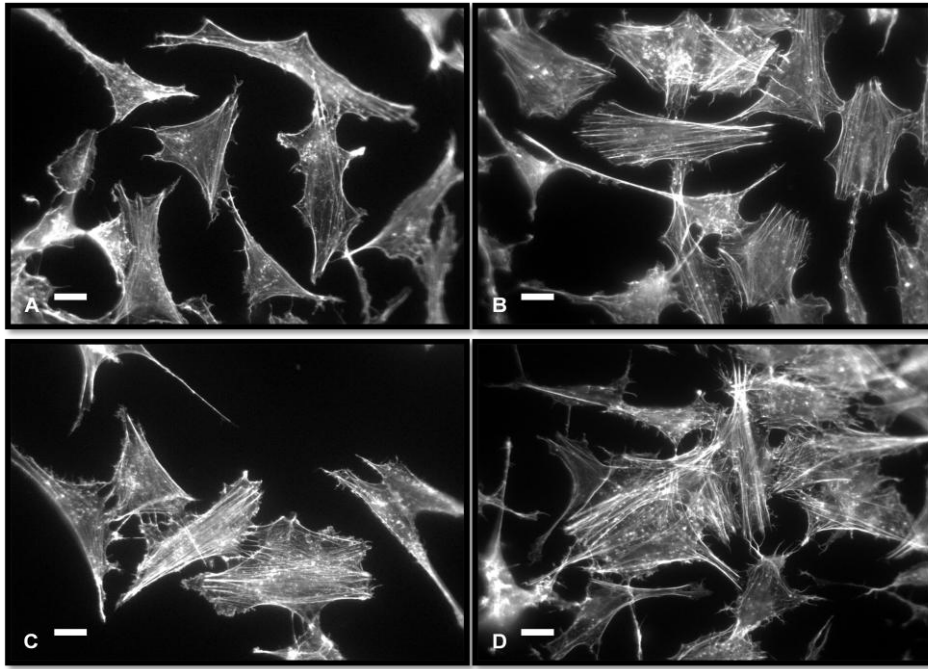


Bild 39: Aktinfärbung von mitteldifferenzierten SH-SY5Y mit Phalloidin-FITC . **(A)** 30 min 0,1% EtOH; **(B)** 30 min DHEA 30 nM; **(C)** 30 min DHEA-Bodipy 30 μ M; **(D)** 30 min DHEA-Bodipy 30 nM. Balken: 10 μ m

Auch die Untersuchung der fokalen Adhäsionskomplexe führt zu den erwarteten Ergebnissen. Auch hier wurde eine Doppelfärbung der Zellen durchgeführt. Der Nachweis von fokalen Adhäsionskomplexen erfolgte über eine Anti-Vinculin Färbung. Um die Colokalisation der fokalen Adhäsionskomplexe mit dem Aktinskelett nachzuweisen, erfolgte eine zweite Färbung mit Phalloidin-FITC gegen Aktin.

Wie schon in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, sind die fokalen Adhäsionskomplexe bei Kontrollzellen nur vereinzelt zu beobachten und befinden sich dann in der Peripherie. Eine Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA und 10 μ M LPA führt neben der massiven Ausbildung von Stressfasern, zur erhöhten Bildung von großen fokalen Adhäsionskomplexen, die meist in der Peripherie, seltener im Zentrum der Zelle lokalisiert sind. Auch die Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA-Bodipy induziert die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe, die meist in der Peripherie der Zelle lokalisiert sind. Die Kombination von 30 nM DHEA-Bodipy und 10 μ M LPA führt, wie auch für DHEA zu beobachten ist, zu einer zusätzlichen Bildung von großen fokalen Adhäsionskomplexen. Auch hier sind die Komplexe sowohl in der Peripherie als auch zentral zu beobachten. Die Zellen bilden unter Einfluss des Rho-Kinase Inhibitors Y-27632 einen neuronartigen Zelltyp aus, in dem keinerlei Stressfasern und fokale Adhäsionskomplexe zu detektieren sind. Bei der Kombination von Y-27632 und 30 nM DHEA wurde weder die Reorganisation von Stressfasern noch die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen beobachtet. Dies trifft auch in Kombination mit 30 nM DHEA-Bodipy zu.

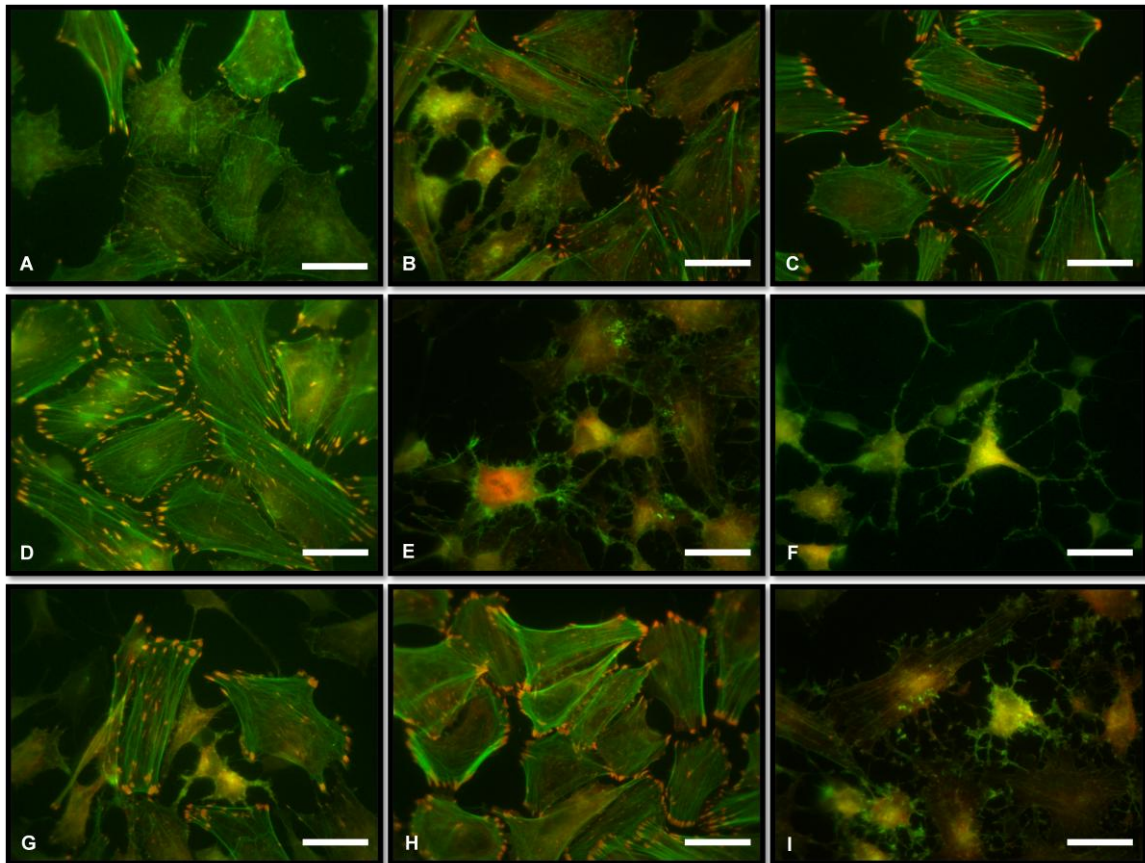


Bild 40: Doppelfärbung von Aktin (grün) und Vinculin (rot) in undifferenzierten SH-SY5Y. Die roten Strukturen der Vinculin-Färbung markieren die fokalen Adhäsionskomplexe; **(A)** 30 min 0,1% EtOH; **(B)** 30 min 30 nM DHEA; **(C)** 30 min 10 μ M LPA; **(D)** 30 min 10 μ M LPA + 30 min 30 nM DHEA; **(E)** 30 min 10 μ M Y-27632; **(F)** 30 min 10 μ M Y-27632 + 30 min 30 nM DHEA; **(G)** 30 min 30 nM DHEA-Bodipy; **(H)** 30 min 10 μ M LPA + 30 min 30 nM DHEA -Bodipy; **(I)** 30 min 10 μ M Y-27632 + 30 min 30 nM DHEA-Bodipy. Balken: 20 μ m

3.11 Zelluläre Lokalisation von DHEA

3.11.1 Zelluläre Lokalisation von DHEA-Bodipy

Für die Lokalisationsstudien des synthetisierten DHEA-Bodipy wurden mitteldifferenzierte SH-SY5Y-Zellen zunächst 20 Minuten mit dem Mitochondrien-Farbstoff Mitotracker® orange (500 nM) vorbehandelt. Dann erfolgte die Inkubation mit DHEA-Bodipy (30 μ M und 30 nM) für 30 Minuten. Die Zellen wurden anschließend fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (**siehe Bild 42 A, D und G**) des DHEA-Bodipy (Anregungswellenlänge: 490 nm) zeigen die Lokalisation des Steroids in den Mitochondrien. Die Mitochondrien sind unter dem Fluoreszenzmikroskop leicht als fadenartige Gebilde zu erkennen, die in Kontrollzellen diffus im gesamten Cytoplasma verteilt sind. Die Behandlung mit DHEA (30 μ M und 30 nM) induziert eine ringförmige Akkumulation der Mitochondrien um den Zellkern herum (**siehe Bild 41 B und C**). Die Bilder B, E und H in Bild 42 zeigen die Mitochondrien der Zellen. Zur eindeutigen Bestimmung der Kompartimentierung wurden die Aufnahmen von DHEA-Bodipy und den Mitochondrien übereinander gelegt.

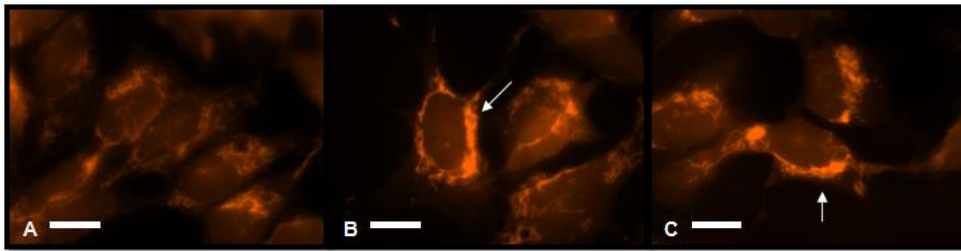


Bild 41: Fluoreszenzmikroskopie der Mitochondrien von mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen (100x); Die Mitochondrien wurden mit dem Farbstoff Mitotracker® orange 20 min (500 nM) angefärbt. **(A)** 30 min 0,1% EtOH; **(B)** 30 min DHEA 30 µM; **(C)** 30 min DHEA 30 nM; Pfeile deuten auf ringförmige, perinukleäre Akkumulation der Mitochondrien hin. Balken: 10 µm

Die Bilder C, F und I in Bild 42 zeigen eine eindeutige Übereinanderlagerung, die sich in einer gelben Färbung bemerkbar macht.

Somit kann eindeutig bestätigt werden, dass DHEA bei beiden eingesetzten Konzentrationen innerhalb von 30 Minuten in den Mitochondrien lokalisiert wird. Der Verlauf dieses Transports ist in Abschnitt 3.12 dargestellt.

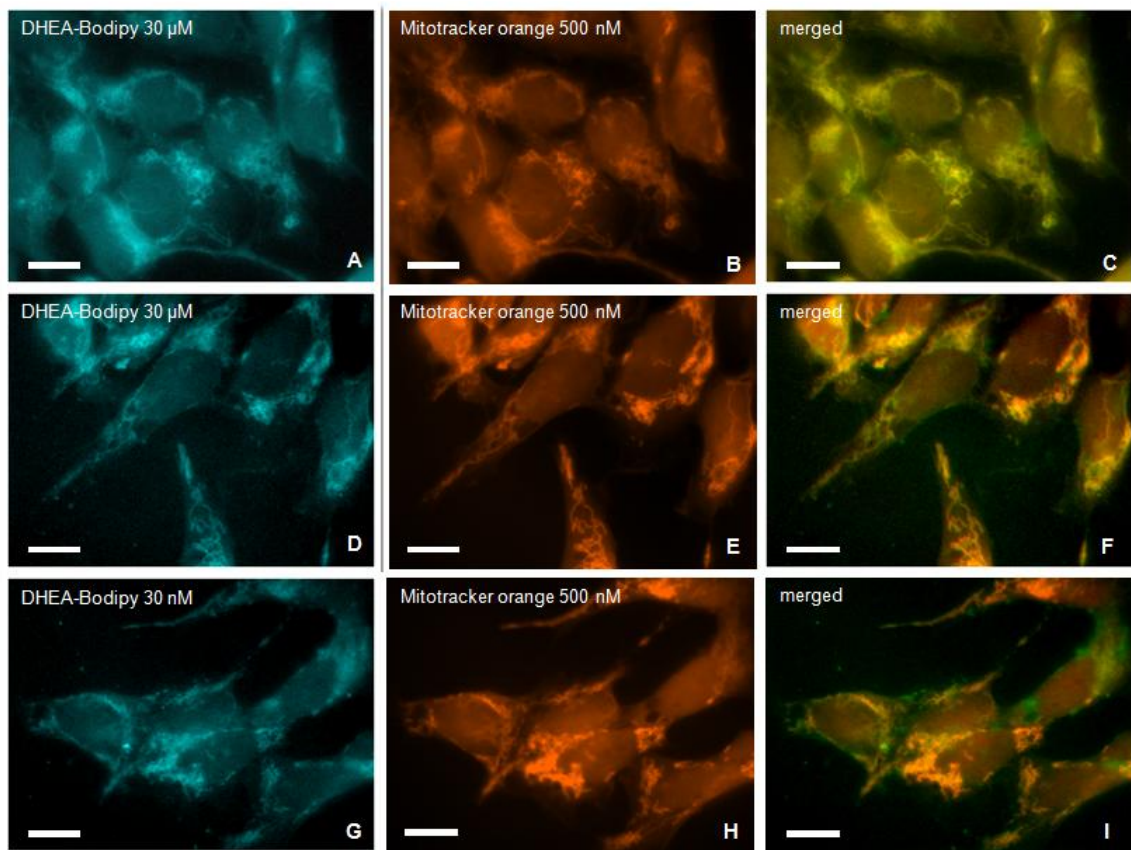


Bild 42: Fluoreszenzmikroskopie von mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen (1000x); **(A)**, **(D)** und **(G)** zeigen die Fluoreszenzaufnahmen von DHEA-Bodipy; **(B)**, **(E)** und **(H)** zeigen die Fluoreszenzaufnahmen von Mitotracker® orange; **(C)**, **(F)** und **(I)** zeigen eine Übereinanderlagerung der Fluoreszenzaufnahmen beider Farbstoffe. Es ist eine Colokalisation von DHEA-Bodipy und Mitotracker® orange zu erkennen. Balken: 10 µm

3.11.2 Bestimmung der Lokalisation von DHEA mittels Antikörper

Zum Vergleich der mittels DHEA-Bodipy gewonnenen Ergebnisse, wurde die Lokalisation von DHEA auch mittels eines gegen DHEA gerichteten Antikörpers untersucht. Dazu

wurden ebenfalls mitteldifferenzierte SH-SY5Y-Zellen 30 Minuten mit 30 μM bzw. 30 nM DHEA behandelt und anschließend fixiert. Nach der Fixierung und der Permeabilisierung erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung mit den entsprechenden Antikörpern. Der Antikörper detektierte das exogen zugesetzte DHEA (30 μM und 30 nM) in mehreren Kompartimenten. Hauptsächlich wird DHEA in den Mitochondrien (gelber Pfeil) und dem Zellkern (roter Pfeil) lokalisiert. Zusätzlich konnte DHEA an filamentösen Strukturen detektiert werden, wobei es sich um Aktin handeln könnte (grüner Pfeil). Es kam auch zu einer Markierung der äußeren Zellstrukturen, hierbei könnte es sich um die Plasmamembran (weißer Pfeil) handeln.

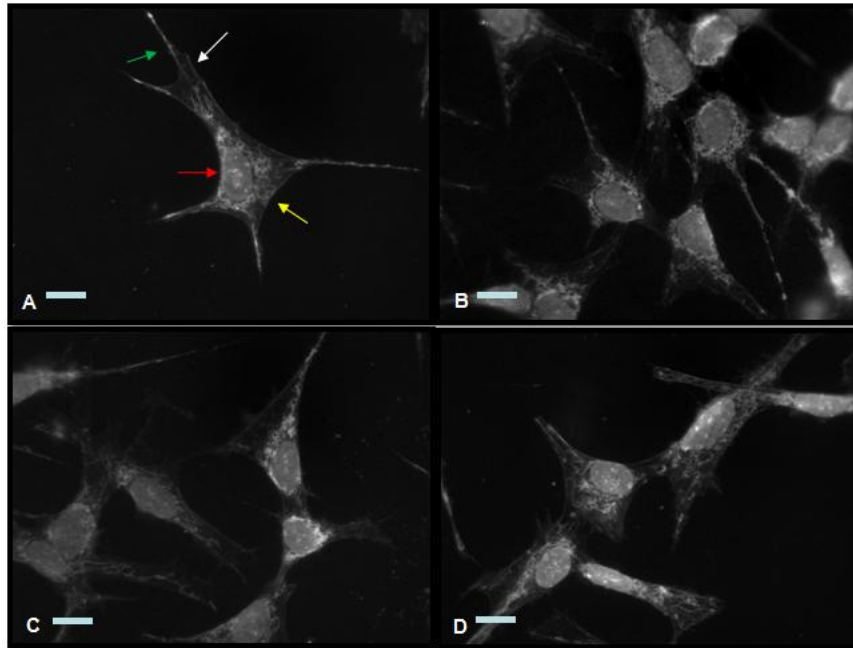


Bild 43: Immunfluoreszenzfärbung zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von exogenem DHEA mittels DHEA-Antikörper; Die mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen wurden mit 1. AK: Anti-DHEA und 2. AK: Cy3 behandelt. **(A)+(B)** 30 min DHEA 30 μM ; **(C)+(D)** 30 min DHEA 30 nM. Belichtungszeit: 400 ms; Balken: 10 μm

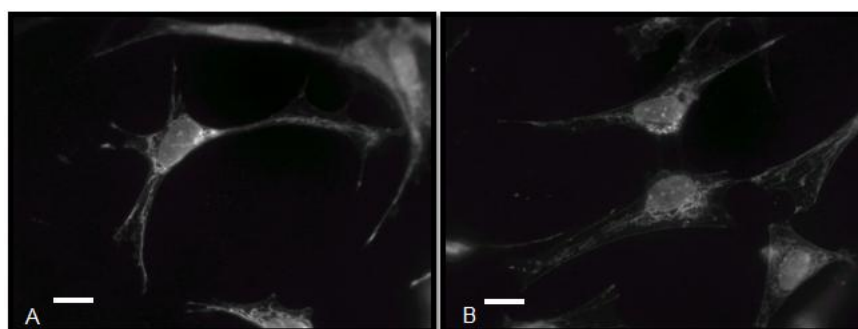


Bild 44: Immunfluoreszenzfärbung zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von endogenem DHEA mittels DHEA-Antikörper; Die mitteldifferenzierten SH-SY5Y-Zellen wurden mit 1. AK: Anti-DHEA und 2. AK: Cy3 behandelt. **(A)+(B)** Kontrolle; Belichtungszeit: 600 ms; Balken: 10 μm

Der Antikörper detektierte endogenes DHEA in den gleichen zellulären Strukturen (**Bild 44**). Die Fluoreszenz der Mitochondrien war jedoch schwächer (Belichtung 600 ms) als bei exogen zugesetztem DHEA in beiden Konzentrationsbereichen.

3.12 Transportstudien mit DHEA-Bodipy

Für die Transportstudien des DHEA-Bodipy wurden mitteldifferenzierte SH-SY5Y-Zellen für 5, 10, 20 und 30 Minuten mit dem Steroid (30 μM und 30 nM) behandelt und anschließend sofort fixiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Nach 5 Minuten liegt das DHEA-Bodipy (30 nM) diffus im Cytoplasma verteilt vor. Nach dieser Inkubationszeit ist noch keine subzelluläre Kompartimentierung zu erkennen. Nach 10 und 20 Minuten wird das Steroid ringartig um den Zellkern lokalisiert. Zu beiden Zeitpunkten sind vereinzelt schon mitochondriale Strukturen zu erkennen. Nach 30 Minuten kommt es dann zu einem erheblichen Anstieg der Fluoreszenz in der Peripherie des Zellkerns und die mitochondrialen Strukturen sind nun gut zu erkennen (**Bild 45**).

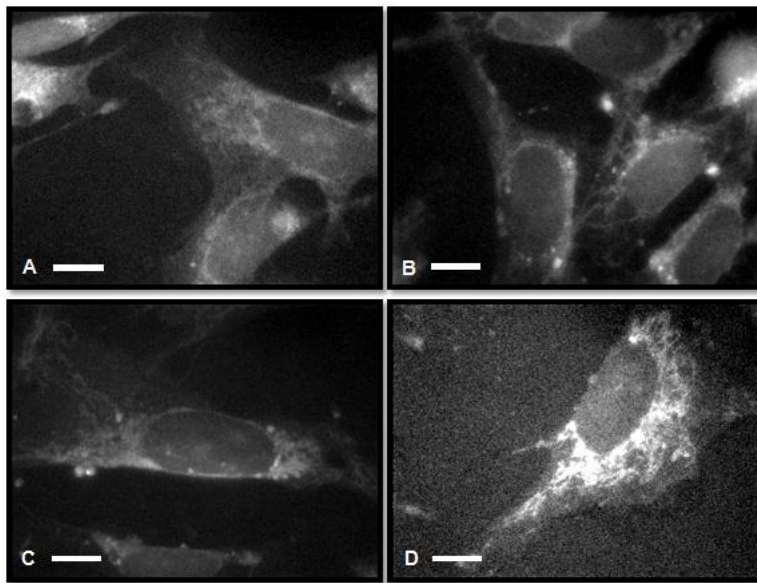


Bild 45: Zeitreihe der Lokalisation von DHEA-Bodipy bei einer Konzentration von 30 nM; Bilder zeigen mitteldifferenzierte, fixierte SH-SY5Y-Zellen (1000x); **(A)** DHEA-Bodipy 30 nM nach 5 min; **(B)** DHEA-Bodipy 30 nM nach 10 min; **(C)** DHEA-Bodipy 30 nM nach 20 min; **(D)** DHEA-Bodipy 30 nM nach 30 min. Balken: 10 μm

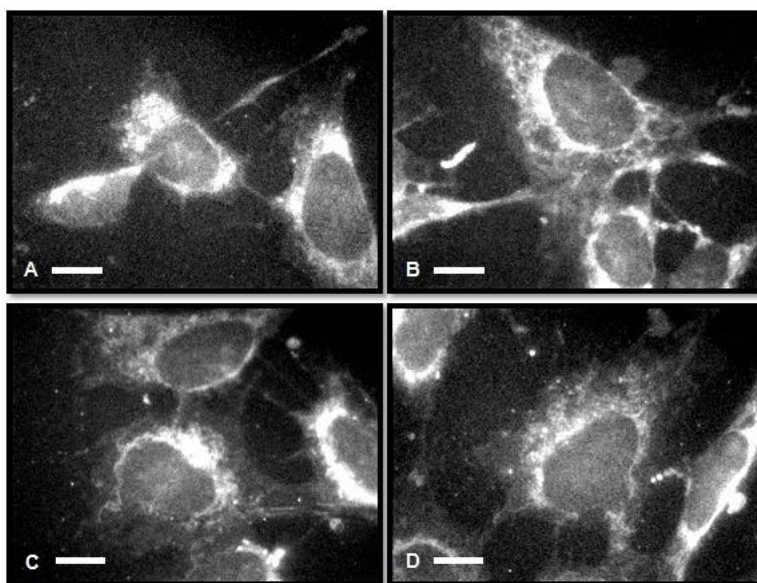


Bild 46: Zeitreihe der Lokalisation von DHEA-Bodipy bei einer Konzentration von 30 μM ; Bilder zeigen mitteldifferenzierte, fixierte SH-SY5Y-Zellen (1000x); **(A)** DHEA-Bodipy 30 μM nach 5 min; **(B)** DHEA-Bodipy 30 μM nach 10 min; **(C)** DHEA-Bodipy 30 μM nach 20 min; **(D)** DHEA-Bodipy 30 μM nach 30 min. Balken: 10 μm

Die Inkubation mit 30 μM DHEA-Bodipy führt zu einem sehr schnellen Transport des Steroids in die Mitochondrien. In Bild 46 A ist gut zu erkennen, dass das Steroid bereits nach 5 Minuten ringförmig um den Zellkern lokalisiert ist. Mitochondriale Strukturen sind jedoch nicht zu erkennen. Nach 10 Minuten kommt es dann zu einem peripheren Transport des Steroids und die mitochondrialen Strukturen werden sichtbar. Nach 20 und 30 Minuten ist keine Veränderung mehr zu beobachten.

3.12.1 Induktion von Stressfasern und Filopodien in Abhängigkeit der Lokalisation von DHEA

Ausgehend von den Transportstudien mit DHEA-Bodipy wurde im folgenden Abschnitt untersucht, nach welcher Zeit es zur Bildung von Filopodien und Stressfasern durch DHEA kommt und inwieweit diese Bildung von der Lokalisation des Steroids abhängt.

Bei der Behandlung mitteldifferenzierter SH-SY5Y-Zellen mit 30 nM DHEA-Bodipy kommt es nach 10 Minuten zum Abrunden der Zellen und zur Ausbildung von Filopodien, Stressfasern sind nach dieser Inkubationszeit noch nicht zu detektieren. Die Bildung der Stressfasern erfolgt erst nach 20 Minuten.

Die Inkubation der Zellen mit 30 μM DHEA-Bodipy führt bereits nach 5 Minuten zum Abrunden der Zellen und zur Ausbildung von Filopodien. Die Stressfasern werden dann nach 10 Minuten ausgebildet.

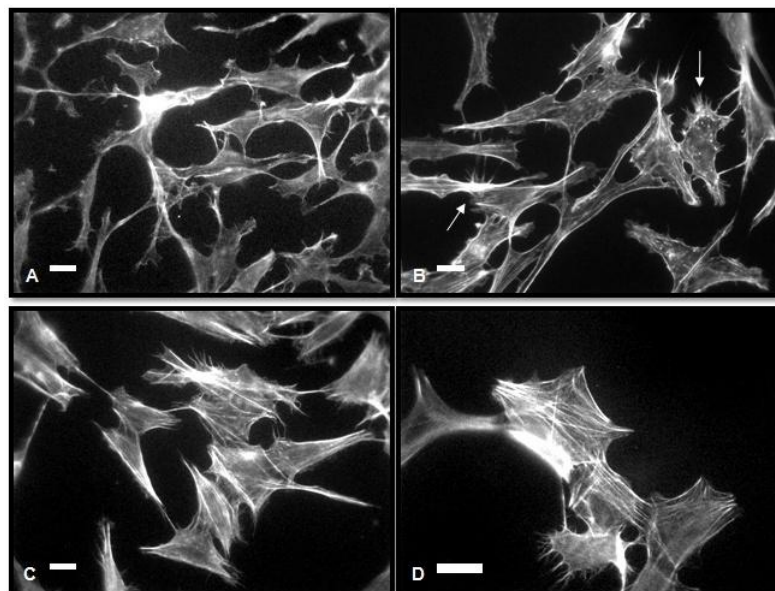


Bild 47: Aktinfärbung von mitteldifferenzierten SH-SY5Y mit Phalloidin-FITC . Zeitreihe zur Stimulation der Zellen mit 30 nM DHEA-Bodipy; **(A)** 5 min DHEA-Bodipy 30 nM; **(B)** 10 min DHEA-Bodipy 30 nM, Pfeile in **(B)** zeigen auf Filopodien; **(C)** 20 min DHEA-Bodipy 30 nM; **(D)** 30 min DHEA-Bodipy 30 nM. Balken: 10 μM

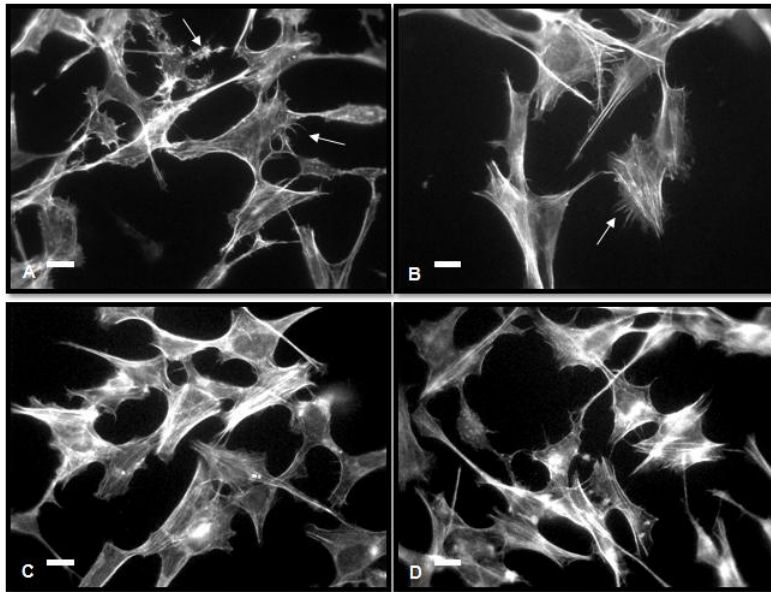


Bild 48: Aktinfärbung von mitteldifferenzierten SH-SY5Y mit Phalloidin-FITC . Zeitreihe zur Stimulation der Zellen mit 30 μ M DHEA-Bodipy; **(A)** 5 min DHEA-Bodipy 30 μ M; **(B)** 10 min DHEA-Bodipy 30 μ M, Pfeil in **(B)** zeigt auf Filopodien; **(C)** 20 min DHEA-Bodipy 30 μ M; **(D)** 30 min DHEA-Bodipy 30 μ M. Balken: 10 μ M

In beiden Konzentrationsbereichen sind erst die Ausbildung von Filopodien und das Abrunden der Zellen zu beobachten. Zum Zeitpunkt der Bildung von Filopodien ist das Steroid in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert, befindet sich aber noch nicht in den Mitochondrien. Die Stressfasern werden ebenfalls in beiden Konzentrationsbereichen erst gebildet, wenn das Steroid in den Mitochondrien lokalisiert ist.

4.1 Eindeutige Zuweisung der Effekte von Testosteron und die Metabolisierung des P450 Aromatase-Inhibitors Formestan

Meine morphologischen Studien an SH-SY5Y-Zellen zeigen, dass es nach der Behandlung der Zellen mit dem irreversiblen P450 Aromatase-Inhibitor Formestan in keinem der untersuchten Differenzierungsstadien zur Ausbildung von Estradiol-spezifischen Merkmalen (in Form von Filopodien) kommt. Die durch Testosteron induzierte Ausbildung von Neuriten wird durch die Inhibierung der P450 Aromatase nicht verhindert und kann somit eindeutig dem Steroid Testosteron zugeordnet werden. Neben den Testosteron-spezifischen Merkmalen zeigen sich, in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums, weitere morphologische Veränderungen nach der Behandlung der Zellen mit Formestan. Es kann die Bildung von 5α -Dihydrotestosteron-spezifischen und Androstandiol-spezifischen Merkmalen beobachtet werden. Dieser Effekt korreliert dabei mit dem Grad der Differenzierung und wird durch zusätzliche Gabe von Testosteron erheblich gesteigert.

Die Untersuchung der Lipid-Extrakte der verschiedenen Differenzierungsstadien mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie hat ergeben, dass die Behandlung der Zellen mit Formestan zu einer massiven Bildung eines Steroids führt, dessen Masse (290,6) und dünnschichtchromatographische Eigenschaften mit 5α -Dihydrotestosteron übereinstimmen. Das detektierte Steroid wurde auch unter dem Einfluss von Aminogluthethimid gebildet. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um endogen gebildetes DHT handelt.

Die Struktur von Formestan ist Androstendion sehr ähnlich. Androstendion stellt ein natürliches Substrat der Aromatase dar. Studien an männlichen und weiblichen Probanden haben ergeben, dass nach der oralen und intramuskulären Gabe von Formestan zahlreiche Metaboliten dieses Aromatase-Inhibitors über den Urin ausgeschieden werden. Formestan wird intensiv metabolisiert.

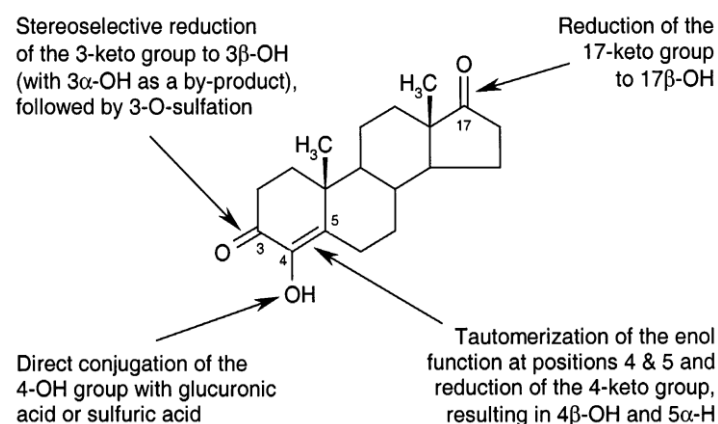


Abbildung 36: Hauptwege der Biotransformation von Formestan im humanen Organismus (Lønning, 2001)

Man unterscheidet bei der Umwandlung von Formestan einen Phase I Metabolismus und einen Phase II Metabolismus. Der Phase I Metabolismus ist hauptsächlich reduktiv,

Oxidationen kommen nur sehr selten vor. In Phase I dominiert die stereoselektive Reduktion der 3-Keto-Gruppe zu 3β -OH oder 3α -OH, mit einem Verhältnis der β -Form zur α -Form von 7:3. Weiter kommt es zu einer Reduktion der 17-Keto-Gruppe, die zur Bildung einer 17β -OH-Gruppe führt. Man geht davon aus, dass diese Reduktions-Reaktionen durch Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD), wie der 3β -HSD, 3α -HSD und der 17β -HSD katalysiert werden. Die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 3α -HSD und 17β -HSD werden auch in SH-SY5Y-Zellen exprimiert (Maggi, 1998). Ein weiterer reduktiver Prozess findet an der Enol-Funktion an den Positionen 4 und 5 statt. Eine Tautomerisierung führt zu einer 4-Keto-Gruppe, die dann reduziert wird. Dabei entstehen 4β -OH und 5α -H. Die katalysierenden Enzyme dieser Reaktionen sind bis heute unbekannt. Der Phase II Metabolismus führt zu Glucuronisierung und Sulfatierung der 4-Hydroxy-Gruppe von Formestan.

In Phase I konnten als allererstes 5α -Steroide ($3\alpha,4\beta$ -dihydroxy- 5α -androstan-17-on; $3\beta,4\alpha$ -dihydroxy- 5α -androstan-17-on; $3\alpha,4\alpha$ -dihydroxy- 5α -androstan-17-on) detektiert werden (Lønning, 2001) (Kohler, 2007).

Aufgrund der Tatsache, dass SH-SY5Y über alle zur Metabolisierung benötigten Enzyme verfügen, kann man davon ausgehen, dass Formestan von SH-SY5Y-Zellen in Abhängigkeit des Differenzierungsstatus zu 5α -DHT und weiter zu 3α -Diol (Androstandiol) metabolisiert wird. Zusätzlich könnte es noch zu einem Verstärkungseffekt durch endogen gebildetes Testosteron kommen, wenn es durch die Inhibierung der P450 Aromatase nicht zu Estradiol umgesetzt werden kann. Die Inhibierung der P450 Aromatase könnte zu einer Akkumulation von endogenem Testosteron führen und nachfolgend eine Steigerung der 5α -Reduktase-Aktivität bewirken. Die Kombination von Testosteron und Formestan induziert in differenzierten SH-SY5Y eine verstärkte Bildung von Androstandiol-spezifischen Merkmalen. Dies lässt vermuten, dass die durch Formestan erhöhte Aktivität der 5α -Reduktase, das exogen zugesetzte Testosteron schneller zu 5α -DHT und Androstandiol umsetzt. Dies schließt eine gesteigerte Aktivität oder Expression der beteiligten Enzyme bei höherer Differenzierung mit ein. Eine vom Differenzierungsstatus abhängige Metabolisierung von Testosteron zu 5α -DHT und 17β -Estradiol wurde schon im Rahmen meiner Diplomarbeit diskutiert. Studien anderer Arbeitsgruppen ergaben bislang nur eine signifikante Steigerung der Expressionsrate und der Aktivität der 5α -Reduktase I, wenn die Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen mit TPA erfolgte. Des Weiteren soll es nach der Differenzierung der Zellen mit RA zu einer Verminderung der Aktivität der 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase kommen, nach der Differenzierung der Zellen mit TPA soll diese unverändert bleiben (Melcangi, 1993) (Wozniak, 1998). Anhand der vorangegangenen und hier durchgeführten Untersuchungen kann eine Steigerung sowohl der 5α -Reduktase I und der 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase als auch der P450-Aromatase nicht ausgeschlossen werden. Die Differenzierung der Zellen mit RA und TPA sind qualitativ sehr unterschiedlich. Nur nach der Differenzierung der Zellen mit TPA kommt es zu einer gesteigerten Expression des Proto-Onkogens c-fos. Es ist hinreichend bekannt, dass es eine starke Korrelation zwischen der Expression von c-fos und der zellulären Stimulations sensitivität gibt (Melcangi, 1993). Die im

Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden mit einer 10fach höheren Konzentration an Retinolsäure differenziert und 24 h vor Versuchsbeginn ein Serumentzug durchgeführt. Die Arbeitsgruppe um Yoshihiro Tsuruo wies nach, dass sich die subzelluläre Lokalisation der 5α -Reduktase in C_6 Gliomazellen der Ratte durch den Entzug des Serums verändert (Tsuruo, 1998).

Somit ist nicht auszuschließen, dass eine veränderte Lokalisation des Enzyms auch zu einer veränderten und eventuell gesteigerten Aktivität führt.

Formestan wird zur Bekämpfung von Mammacarcinomen bei Frauen nach der Menopause eingesetzt. Durch die Metabolisierung von Formestan z.B. zu 4-Hydroxytestosteron wurden zahlreiche androgene Effekte beobachtet. Dabei verringerte sich der Plasmaspiegel von Estradiol von 10-11 pg/ml auf fast 4 pg/ml. Neurologisch führt ein herabgesetzter Estradiol-Spiegel zu einem Verlust von kognitiven Fähigkeiten, zur Steigerung von depressiven Verstimmungen und zu einer Förderung von neurodegenerativen Erkrankung bei Frauen. Aus diesem Grunde wird Frauen nach der Menopause eine Estradiol-Ersatz Therapie empfohlen. Estradiol wirkt bei beiden Geschlechtern neuroprotektiv. Ebenso wird zahlreichen Vorläufern von Estradiol, wie Pregnenolon, DHEA und Testosteron eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben (Garcia-Segura, 2003) (Santen, 1999; 2003). Dabei ist nicht ganz auszuschließen, dass dieser neuroprotektive Effekt durch die Metabolisierung dieser Steroide in Estradiol zustande kommt. Testosteron fördert das Überleben von spezifischen Populationen von Neuronen (Rasika, 1999), induziert die Regeneration von Motor-Axonon (Perez, 1996), verhindert die mit dem Morbus Alzheimer assoziierte Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (Papazosomenos, 1997) und reduziert die neuronale Sekretion des β -Amyloid-Peptids (Gouras, 2000), das ebenfalls mit dem Morbus Alzheimer assoziiert ist. Es reduziert auch Apolipoprotein E4 induzierte kognitive Defizite (Raber, 2002). Ein Teil dieser Effekte scheint auf die Aktivierung von Androgen-Rezeptoren zurückzugehen. 5α -Dihydrotestosteron bindet auch an Androgen-Rezeptoren, bewirkt aber keine vergleichbaren neuroprotektiven Effekte. Interessanterweise kann 5α -Dihydrotestosteron nicht in Estradiol umgewandelt werden (Azcoita, 2001). Es ist zu klären, ob das Gehirn selbst oder die Peripherie als Hauptquelle der Aromatase-Substrate dient. Dass das Gehirn Testosteron synthetisieren kann, ist unumstritten. Dennoch konnte noch nicht genau lokalisiert werden, in welcher Region es zu einer so signifikanten Testosteron-Synthese kommt, die ausreicht, um neuroprotektive Eigenschaften aufzuweisen. Auch die Umwandlung von Testosteron-Vorläufern wie DHEA und Pregnenolon ist in vivo noch nicht ganz geklärt. Die Gabe von Formestan könnte somit auch den Steroid-Metabolismus im Gehirn beeinflussen, wenn es zu 5α -Dihydrotestosteron metabolisiert wird. Zum einen würde es nicht nur die Aktivität der neuronalen P450 Aromatase inhibieren, sondern auch zu einer massiven Erhöhung der Konzentration von 5α -Dihydrotestosteron führen. Durch diesen Effekt und das massive Absenken des Estradiol-Spiegels könnte es zur Förderung neurodegenerativer Erkrankungen kommen.

4.2 Eindeutige Zuweisung der Effekte von Testosteron und die Metabolisierung von Testosteron bei inhibierter 5 α -Reduktase

Die Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit Finasterid inhibiert die Ausbildung 5 α -DHT-spezifischer Merkmale nach der Zugabe von Testosteron. Die Aktivität der 5 α -Reduktase I konnte vollständig inhibiert werden. Dies bestätigt, dass die Effekte der Ausbildung von langen Neuriten eindeutig dem Steroid Testosteron zugewiesen werden können. Die alleinige Behandlung der Zellen mit Finasterid führt zur Ausbildung 17 β -Estradiol-spezifischer Merkmale.

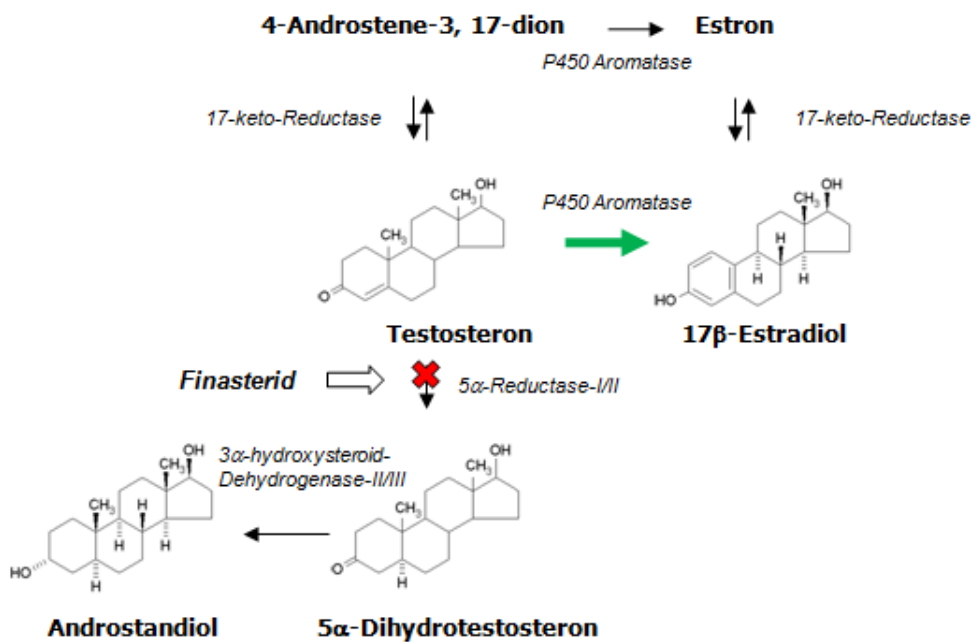


Abbildung 37: Durch die Inhibition der 5 α -Reduktase wird endogenes und exogenes Testosteron vermehrt durch die P450 Aromatase in 17 β -Estradiol umgewandelt (grüner Pfeil). Die Aktivität der P450 Aromatase scheint dabei von der Konzentration des Steroids und der Differenzierung der Zellen abhängig zu sein.

Dieser Effekt kann durch exogen zugesetztes Testosteron gesteigert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch die Inhibition der 5 α -Reduktase zu einer erhöhten Metabolisierung von endogenem und exogenem Testosteron in 17 β -Estradiol kommt. Die Verstärkung der Effekte durch die zusätzliche Gabe von exogenem Testosteron lässt vermuten, dass eine Erhöhung der Testosteronkonzentration zu einer Aktivitätssteigerung der P450 Aromatase führt.

4.3 Eindeutige Zuweisung der Effekte von DHEA und die Metabolisierung von DHEA bei inhibierter Sulfotransferase

Nach der Behandlung der SH-SY5Y-Zellen mit Naphthylethanol werden in allen Differenzierungsstadien keinerlei DHEA-S-spezifische Merkmale detektiert. Somit sind die Effekte der Ausbildung von Filopodien und die Kontraktion der Zellen eindeutig dem Steroid DHEA zuzuweisen.

Die alleinige Behandlung der Zellen mit Naphthylethanol führt im undifferenzierten Stadium zur verstärkten Ausbildung DHEA-spezifischer Merkmale. Mit steigender Differenzierung kommt es dann zur Ausbildung Testosteron- und 5α -DHT-spezifischer Merkmale. In Kombination von Naphthylethanol und DHEA werden neben Testosteron-spezifischen Merkmalen auch 17β -Estradiol-spezifische Merkmale im ausdifferenzierten Stadium beobachtet. Meinen Ergebnissen zufolge kommt es durch die Inhibierung der Sulfotransferase im undifferenzierten Stadium zu einer Akkumulation von endogenem DHEA. Dieser Effekt kann durch die zusätzliche Gabe von exogenem DHEA verstärkt werden. Eine Weitermetabolisierung von exogenem DHEA wurde in diesem Stadium nicht beobachtet. Eine Differenzierung der Zellen führt dann zu einer gesteigerten Metabolisierung von endogenem und exogenem DHEA zu Testosteron. Im ausdifferenzierten Stadium induziert die Kombination von Naphthylethanol und DHEA die Synthese von 17β -Estradiol. Dies deutet darauf hin, dass es mit zunehmender Differenzierung zu einer gesteigerten Aktivität der steroidogenen Enzyme 3β -HSD, 17-Keto-Reduktase und 5α -Reduktase kommt. Eine Aromatisierung von Testosteron in 17β -Estradiol wurde nur im ausdifferenzierten Stadium nach Zugabe von exogenem DHEA beobachtet. Dies weist daraufhin, dass eine erhöhte Konzentration von DHEA oder der entstehenden Folgemetaboliten zu einer zusätzlichen Aktivitätssteigerung der P450 Aromatase führt.

Die Metabolisierung von DHEA zu Testosteron kann auf zwei Wegen erfolgen. DHEA kann zu seinen hydroxylierten Metaboliten 7α -Hydroxy-DHEA und 7β -Hydroxy-DHEA metabolisiert werden. Dies führt dann im nächsten Schritt zur Bildung von Androstendiol und Androstentriol. Androstendiol wird dann über die Aktivität der 3β -HSD zu Testosteron metabolisiert.

Der andere Weg umfaßt die Metabolisierung von DHEA zu Androstendion, ebenfalls über die Aktivität der 3β -HSD. Androstendion kann sowohl durch die 17-Keto-Reduktase zu Testosteron als auch durch die P450 Aromatase zu Estron metabolisiert werden. Sowohl Estron als auch Testosteron können dann zu 17β -Estradiol metabolisiert werden. Die Stimulation der Zellen mit Androstendion und Estron zeigen spezifische Merkmale, die denen von Testosteron sehr ähnlich sind. Eine Metabolisierung von Androstendion über Estron zu 17β -Estradiol scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein, da in höher differenzierten Stadien der Zellen auch 5α -DHT-spezifische Merkmale auftreten. Meine Beobachtungen favorisieren somit die Synthese von Testosteron und die anschließende Metabolisierung zu

17 β -Estradiol über die P450 Aromatase. Als Vorläufer von Testosteron kommen sowohl Androstenediol als auch Androstendion in Frage.

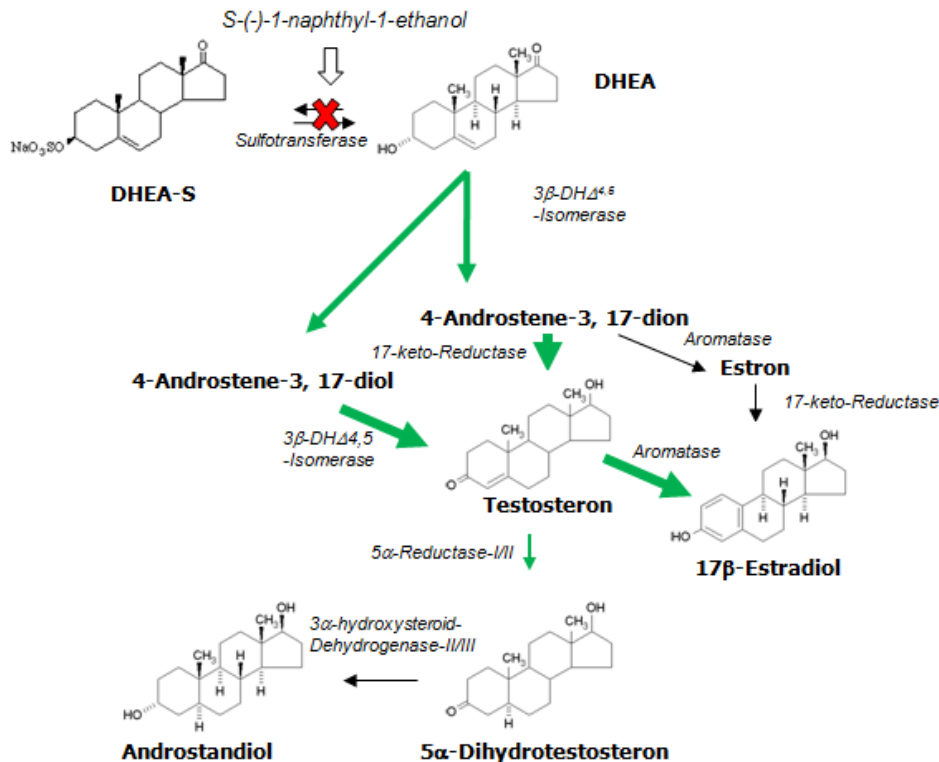


Abbildung 38: Durch die Inhibierung der Sulfotransferase wird endogenes DHEA vermehrt zu Testosteron metabolisiert. Als Vorläufer von Testosteron kommen 4-Androsten-3, 17-diol und 4-Androsten-3, 17-dion in Frage. Durch eine Erhöhung der DHEA-Konzentration (exogenes DHEA) wird Testosteron vermehrt in 17 β -Estradiol metabolisiert. Die Aktivität der P450 Aromatase scheint dabei von der Konzentration der Vorläufermetaboliten und dem Grad der Differenzierung abhängig zu sein.

4.4 Beeinflussung der Aktivität steroidogener Enzyme

Allgemein kann man sagen, dass die Inhibierung eines steroidogenen Enzyms die Aktivierung anderer Steroidsynthesewege induziert. Dabei ist die Aktivität der steroidogenen Enzyme maßgeblich vom Differenzierungsstatus der neuronalen Zellen abhängig. Während in undifferenzierten Stadien eine Inhibierung eines steroidogenen Enzyms zu einer Akkumulation des jeweiligen endogen synthetisierten Steroids führt, wird in höher differenzierten Stadien eine Weitermetabolisierung des Steroids über nicht inhibierte Steroidsynthesewege beobachtet. Je höher der Differenzierungsstatus, desto mehr Folgemetaboliten werden gebildet. Diese Effekte werden durch die Zugabe von exogenen Steroiden verstärkt. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität der steroidogenen Enzyme von der Konzentration der Steroide und ihrer Folgemetaboliten abhängig ist.

4.5 Testosteron und die Aktivierung des Rac-Signalwegs

Die Behandlung RA-differenzierter SH-SY5Y-Zellen mit Testosteron führt zu einem Auswachsen von Neuriten mit spezifischen Enden in Form von Wachstumskegeln. Die Untersuchungen des Aktinskeletts haben zusätzlich ergeben, dass es nach der Stimulation der Zellen mit Testosteron zur Verminderung von peripheren und zentralen Stressfasern kommt. Die Behandlung der SH-SY5Y-Zellen mit Rac-Aktivatoren, Rho-Kinase- bzw. MLCK-Inhibitoren führte zu identischen Effekten auf das Aktinskelett. Durch die Stimulation mit Testosteron wurden die durch die Rac-Aktivatoren und die Rho-Kinase bzw. MLCK Inhibitoren induzierten Reorganisationen des Aktinskeletts verstärkt. Diese Effekte deuten darauf hin, dass Testosteron eine Aktivierung des Rac-Signalwegs induziert.

Wie in der Einleitung beschrieben (siehe 1.3.7.2), wurde in LNCaP-Zellen ein Signalweg identifiziert, der über eine Aktivierung eines Membran-Testosteron-Rezeptors zu einer Reorganisation des Aktinskeletts führt. Testosteron induziert dabei die Phosphorylierung der FAK. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Aktivierung der PI3-Kinase und des Rac1/Cdc42 Signalwegs (Kampa, 2004). Die Signalkaskaden, die die Reorganisation des Aktincytoskeletts regulieren, sind sehr komplex und auch Zelltyp-spezifisch. Ein in cytoskelettale Reorganisationsprozesse involvierter Effektor von Rac ist PAK. PAK kann sowohl durch Rac als auch durch Cdc42 aktiviert werden. Eine Aktivierung von PAK führt zum Verlust von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Verminderung oder gar der Verlust von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen nur durch aktiviertes PAK induziert wird (Manser, 1995). Die Entwicklung von Lamellipodien ist nicht unbedingt abhängig von einer Aktivierung von PAK, wird aber durch PAK reguliert. Die Bildung von Lamellipodien bedingt dagegen eine Aktivierung von Rac (Sells, 1999). In PC12 Zellen konnte ein Neuriten-Wachstum durch konstitutiv aktiviertes PAK1 induziert werden (Daniels, 1998). Das in SH-SY5Y-Zellen durch Retinolsäure verursachte Auswachsen von Neuriten wird ebenfalls durch eine Aktivierung von Rac und PAK1 induziert. Darüber hinaus wird die Aktivierung von Rac in SH-SY5Y über die PI3-Kinase reguliert (Pan, 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Stimulation mit Testosteron zu einer Aktivierung von PAK führt und diese Aktivierung durch Rac induziert wird, da es sowohl zum Verlust von Stressfasern als auch zum Auswachsen von Neuriten und Lamellipodien kommt. Die Stimulation der Zellen mit dem Neuropeptid und Rac-Aktivator Bradykinin induzierte die gleichen Effekte auf das Aktinskelett von SH-SY5Y. In Kombination mit Testosteron konnten diese Effekte deutlich gesteigert werden. Eine Stimulierung von SH-SY5Y mit Bradykinin führt nachweislich über eine Aktivierung von Rac und PAK zu einem Influx von Ca^{2+} . Diese Signalkaskade induziert eine Phosphorylierung der MHCs und führt zum Verlust von Stressfasern und zum Auswachsen von Neuriten. Diese Phosphorylierung erfordert wahrscheinlich eine Zusammenarbeit zwischen PAK und der Ca^{2+} /CaM-Kinase. Der Rho-Signalweg wird durch diese Aktivierung abgeschwächt oder

sogar komplett inhibiert (Leeuwen, 1999). Weiter führt eine Aktivierung von PAK zu einer Phosphorylierung und Inhibierung der MLCK. Diese Inhibierung bewirkt eine verminderte Phosphorylierung der MRLCs und führt letztendlich zu einer Deassemblierung von Aktinomyosinfilamenten und den Verlust von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen (Sanders, 1999). Die Inhibierung des Rho-Signalwegs durch den Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 erbrachte die gleichen Ergebnisse. Auch hier kam es in Kombination mit Testosteron zu einer deutlichen Steigerung der Effekte. Die Rac- und Rho-Signalwege stehen in einem inhibitorischen Gleichgewicht zueinander. Die Untersuchungen zweier Arbeitsgruppen weisen auf eine Zelltyp-spezifische Hierarchie zwischen Rho, Rac und Cdc42 hin. In SH-EP-Zellen konnte die Hierarchie Cdc42 > Rac > RhoA nachgewiesen werden (Nobes, 1995) (Dong, 2002).

Eine Aktivierung des Rho-Signalwegs durch LPA konnte durch die Stimulation der Zellen mit Testosteron inhibiert werden. Unter diesen Bedingungen kam es weder zur Induktion von Stressfasern noch zu einem Abrunden der Zellen. Die Kombination zwischen LPA und dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 führte hingegen nicht zu einem so deutlichen Effekt. Die Effekte von LPA konnten reduziert aber nicht völlig inhibiert werden, da die Stressfaserbildung und Morphologie mit der von Kontrollzellen vergleichbar war. Die Kombination von Bradykinin und LPA induzierte die Bildung massiver Stressfasern und die Kontraktion der Zellen.

Somit führte ausschließlich die Stimulation mit Testosteron zu einer völligen Inhibierung des Rho-Signalwegs und die Effekte von Testosteron waren stärker als die des Rac-Aktivators Bradykinin und des Rho-Kinase Inhibitors Y-27632. Unter diesen Bedingungen könnte in SH-SY5Y-Zellen die Hierarchie Rac > Rho > Cdc42 befürwortet werden.

Die Effekte von Testosteron und die damit verbundene Inhibierung des Rho-Signalwegs könnte, neben einer Aktivierung von Rac und PAK, durch einen starken Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration und der folgenden gesteigerten Aktivität der Ca^{2+} /CaM-Kinase verstärkt werden. Neuste Studien konnten belegen, dass ein durch Testosteron verursachter schneller intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg in neuronalen Zellen zum Auswachsen von Neuriten führt. Diese Ca^{2+} -Signale werden über einen Plasmamembran-Rezeptor (G-Protein gekoppelten Rezeptor) initiiert und sind von einem Zusammenspiel zwischen einem $Ins(1,4,5)P_3$ -sensitiven Ca^{2+} -Pool und einem Ca^{2+} -Influx aus dem extrazellulären Medium abhängig (Estrada, 2006). In Neuronen werden auch die Kinase-Systeme PKA, PI3-Kinase, ERK und Src durch Ca^{2+} -Signale stimuliert (Migliaccio, 2000) (Estrada, 2003). Durch eine Aktivierung z.B. von Src wird p190RhoGAP induziert, das letztendlich zu einer Inhibierung des Rho-Signalwegs führt (Burrige, 2004). In RA differenzierten SH-SY5Y-Zellen beeinflusst Src auch die Aktivierung der PI3-Kinase und Rac (Pan, 2005). Das p190RhoGAP kann auch durch Rac aktiviert werden. Diese Aktivierung wird über die Bildung von Sauerstoffradikalen vermittelt, die eine Inhibierung der LMW-PTP (low molecular weight protein tyrosine phosphatase) verursachen. Dies führt dann zu einer Phosphorylierung und Inhibierung von Rho (Burrige, 2004). In PC12 Zellen konnte gezeigt

werden, dass die Aktivierung von Rac durch Bradykinin über die Phospholipase C (PLC) und die PKC induziert wird. Durch die Aktivierung der PLC kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (InsP₃). DAG aktiviert dann die PKC und InsP₃ induziert den Ausstrom von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern (Leeuwen, 1999). Die PKC und PLC abhängige Aktivierung von Rac läuft vermutlich über das RacGEF Tiam1 (Mertens, 2003). Die Inhibierung des Rho-Signalwegs durch die PKC wird über die Aktivierung der c-Src und p190RhoGAP induziert (Brandt, 2002). Das Zusammenspiel der Mitglieder der Rho-GTPasen kann somit auf mehreren Ebenen reguliert werden. Der durch Testosteron induzierte starke Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration könnte ebenfalls das Zusammenspiel der Mitglieder der Rho-GTPasen auf mehreren Ebenen regulieren.

Eine weitere Bestätigung, dass die Stimulation der Zellen mit Testosteron zu einer Inhibierung des Rho-Signalwegs führt, zeigen die Ergebnisse des PKA- und Rho-Kinase Inhibitors H89. Unter dem Einfluss von Testosteron kam es auch hier zu einem deutlichen Verstärkungseffekt.

Die Inhibierung der PI3-Kinase führte zu einem Verlust der durch Testosteron induzierten Effekte. Dies bestätigt, dass das durch Testosteron induzierte Neuritenwachstum und der Verlust von Stressfasern von der Aktivität der PI3-Kinase abhängig sind. Dies lässt vermuten, dass eine Aktivierung von Rac durch Testosteron auch in SH-SY5Y-Zellen über eine Aktivierung der PI3-Kinase induziert wird. Über die PI3-Kinase werden die Signale von Wachstumsfaktor-abhängigen Rezeptoren weitergeleitet. Die Produkte der PI3-Kinase (PIP₂ und PIP₃) stimulieren zahlreiche RacGEFs. Die Beziehung zwischen der Rac-Aktivierung und der Rolle der Phosphoinositole ist sehr komplex, da Rac selbst an die PI4,5-Kinase und die PI-3-Kinase bindet und auch beide aktiviert. Daher geht man davon aus, dass es zwischen der Aktivität von Rac und der Synthese von PIP₂ und PIP₃ ein positives Feedback gibt, das sehr wichtig für eine schnelle Antwort auf extrazelluläre Stimuli wäre. PIP₂ und PIP₃ werden nicht nur in wachsenden Lamellipodien konzentriert, sondern sie spielen auch eine wichtige Rolle bei der durch Arp2/3 vermittelten Aktinpolymerisierung, die für ein Auswachsen von Neuriten unumgänglich ist (Burr ridge, 2004) (Pan, 2005).

Da die Aktivierung der PI3-Kinase viele RacGEFs stimuliert, könnte hier eine weitere Begründung für den starken Effekt von Testosteron zu finden sein.

Der iAR kann ebenfalls eine wichtige Rolle spielen, da auch eine Erhöhung des nukleären Ca²⁺-Spiegels für ein Maximum an Neuritenwachstum essentiell ist (Estrada, 2006). Androgene stimulieren die Differenzierung verschiedener neuronaler Zelltypen über den iAR und die Genexpression. Die nicht-genomischen Effekte könnten eine physiologische Rolle vor der Aktivierung des iAR spielen. Z.B. könnte eine Erhöhung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration die Bindung der Androgene an ihren Rezeptor stimulieren. Diese Bindung könnte dann Ca²⁺-abhängige Signalwege wie ERK, PI3-Kinase oder Src aktivieren, die dann den iAR phosphorylieren und seine Aktivität erhöhen. Eine Arbeitsgruppe erbrachte bereits den Nachweis, dass der AR durch ein RhoGDI aktiviert werden kann. Dies lässt vermuten,

stimulierende Effekte auf die PI3-Kinase, Ca²⁺/CaM-Kinase und Src ausüben. In wieweit der WAVE-Arp2/3-Komplex durch Rac induziert wird, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Eine mögliche Signalweiterleitung von Rac zu diesem Komplex, der die Polymerisierung von Aktin induziert, kann nicht ausgeschlossen werden. Ein Auswachsen von Neuriten könnte auch über eine Aktivierung der PI-4-P5Kinase induziert werden. Bei einer Aktivierung dieser Kinase kommt es ebenfalls zu einer Verminderung des „actin-cappings“ und zum Auswachsen von Neuriten (Burrige, 2004).

4.6 DHEA und die Aktivierung des Rho-Signalwegs

Die Behandlung differenzierter SH-SY5Y-Zellen mit DHEA führt morphologisch zur Abrundung der Zellen und zur Bildung von Filopodien. Bei den Untersuchungen des Aktinskeletts konnte des Weiteren beobachtet werden, dass DHEA die Bildung von zentralen Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen stark induziert. Vergleichende Untersuchungen mit dem Rho-Aktivator LPA zeigten den gleichen Effekt. Durch die Stimulation der Zellen mit LPA kam es ebenfalls zur Bildung massiver Stressfasern und fokaler Adhäsionskomplexe, jedoch nicht zur Bildung von Filopodien. Die durch die Stimulation mit DHEA beobachteten morphologischen Effekte weisen somit auf eine Beteiligung des Rho-Signalwegs hin. Durch die Inhibierung der Rho-Kinase konnten die durch DHEA induzierten Effekte nur noch teilweise beobachtet werden. Es kam zu einem Zurückziehen der Neuriten und zu einem leichten Abrunden der Zellen, die erwartete starke Bildung zentraler Stressfasern blieb dagegen völlig aus. Die durch DHEA induzierte Bildung zentraler Stressfasern bedingt demnach eine Aktivierung der Rho-Kinasen, wohingegen das Zurückziehen der Neuriten unabhängig von den Rho-Kinasen stattfinden kann. Arbeiten anderer Arbeitsgruppen bestätigen diese Beobachtung. Sowohl der Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 als auch der Rho-Kinase und PKA-Inhibitor H89 konnten in allen Untersuchungen ein durch konstitutiv aktiviertes Rho induziertes Abrunden der Zellen nicht verhindern. Es kam lediglich zu einem Verlust an Stressfasern. Man geht davon aus, dass das Zurückziehen von Neuriten und die Bildung von Stressfasern zwar über denselben Signalweg induziert werden, aber unabhängig voneinander sind (Leemhuis, 2002). Die Kombination von DHEA und dem Rho-Aktivator LPA führte zu einer Verstärkung der Effekte. Es kam zur massiven Bildung zentraler und peripherer Stressfasern und auch zur Bildung von Filopodien. Die Bildung zentraler Stressfasern wird vermutlich durch die Rho-Kinasen, die Bildung peripherer Stressfasern durch die MLC-Kinasen reguliert (Kato, 2001). Da nach der Behandlung mit dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 keinerlei Stressfasern durch DHEA induzierbar waren, wurde für weitere Untersuchungen der MLCK-Inhibitor Wortmannin eingesetzt. Die Stimulation der Zellen mit Wortmannin zeigte, dass es zu einem Verlust von peripheren Stressfasern kam, die zentralen Stressfasern waren aber mit denen von Kontrollzellen vergleichbar. Durch die Zugabe von DHEA konnten im zentralen Bereich besonders stark Stressfasern induziert werden. So kann man davon ausgehen, dass die

Induktion von zentralen Stressfasern durch DHEA unabhängig von der Aktivität der MLCK stattfindet und somit durch die Rho-Kinase induziert wird. Eine Beteiligung der MLCK im peripheren Bereich kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden. Eine Bestätigung der Beteiligung der Rho-Kinasen ergaben auch die Untersuchungen der Zellen mit dem Rho-Kinase- und PKA-Inhibitor H89. Die Stimulation der Zellen mit H89 führte, wie bei Y-27632, ebenfalls zum Auswachsen von Neuriten und zum Verlust von Stressfasern. In Kombination mit DHEA kam es aber im Gegensatz zu Y-27632 zu einem völligen Abrunden der Zellen, Stressfasern konnten jedoch auch nicht beobachtet werden. Das extreme Abrunden der Zellen wird vermutlich durch die zusätzliche Inhibierung der PKA ausgelöst. PKA und beide Rho-Kinasen haben unterschiedliche Effekte auf die Bildung von Neuriten. Die Aktivierung der PKA induziert die Bildung von Neuriten und zwar über die Inhibierung von Rho (Dong J. , 1998). Demnach kann man davon ausgehen, dass DHEA Rho aktiviert, die Inhibierung der Rho-Kinase aber die Bildung von Stressfasern verhindert. Das extreme Abrunden der Zellen wird dann vermutlich durch aktiviertes Rho und die Inhibierung der PKA ausgelöst. Das Gleichgewicht der Signalwege liegt hier vermutlich auf der Seite von Rho. Dies ist nicht überraschend, da nachgewiesen werden konnte, dass die Effekte des Inhibitors H89 auf die Rho-Kinasen den Effekt auf die Inhibierung der PKA maskieren (Leemhuis, 2002). Eine durch Bradykinin induzierte Aktivierung des Rac-Signalwegs konnte weder die Effekte von DHEA noch die von LPA unterdrücken. In beiden Fällen kam es in Kombination mit Bradykinin zu einer verstärkten Bildung von Stressfasern und zum Abrunden der Zellen. Dieser Effekt könnte mit dem verwendeten Zeitfenster zusammenhängen. Die Phosphorylierung der MHCs durch Bradykinin erfolgt sehr schnell. Sie erreicht ihr Maximum nach etwa zwei Minuten und nach etwa 40 Minuten wieder die Basislinie (Leeuwen, 1999). Die Kontrollen bestätigten, dass nach 30 Minuten Stimulation mit Bradykinin keinerlei Stressfasern zu detektieren waren. In Kombination mit 30 Minuten DHEA und LPA wurden diese aber wieder ausgebildet. Dies könnte bestätigen, dass nach etwa 35 Minuten die Basislinie erreicht sein muss, da die Aktivierung von Rac durch ein Rückgang der MHC-Phosphorylierung nicht mehr ausreicht, um den Rho-Signalweg zu inhibieren. Eine weitere Begründung für den stärkeren Effekt von DHEA gegenüber Bradykinin könnte auch eine Inhibierung der durch Bradykinin induzierten Ca^{2+} -Signale sein. DHEA kann die durch Agonisten (z.B. Bombesin) induzierten Ca^{2+} -Signale erheblich herabsetzen (Liu, 2006). Dieser Effekt setzt vermutlich die durch Bradykinin induzierten Ca^{2+} -Signale und die Aktivierung der Ca^{2+} /CaM-Kinase herab. Da die Ca^{2+} /CaM-Kinase und die Aktivität der PAK-Kinasen voneinander abhängig sind (BurrIDGE, 2004) (Leeuwen, 1999), könnte dies zu einer Herabsetzung der Phosphorylierung des MHCs führen und somit das Gleichgewicht zugunsten des Rho-Signalwegs verschieben. Bei der Untersuchung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins (MRLC) bestätigte sich, dass DHEA die Phosphorylierung an Serin19 der MRLCs erhöht und somit der Rho-Signalweg definitiv durch DHEA induziert wird. Die Phosphorylierung der MRLCs an Serin19 durch die MLCK spielt in neuronalen Zellen eine eher untergeordnete Rolle. Die Aktivität der MRLCs wird in neuronalen Zellen

hauptsächlich durch die Rho-Kinasen kontrolliert. Die erhöhte Phosphorylierung der MRLCs kann entweder indirekt über eine Inhibierung der Myosin-Phosphatase oder über eine direkte Phosphorylierung der MRLCs durch die Rho-Kinase erzielt werden (Amano, 1996) (Kawano, 1999). Dabei kann es neben einer Monophosphorylierung der MRLCs an Ser19 auch zu einer Diphosphorylierung der MRLCs an Thr18/Ser19 kommen (Ueda, 2002).

Eine Beteiligung der MLCK kann ausgeschlossen werden, da DHEA trotz der Inhibierung der MLCK die Bildung von zentralen Stressfasern induzierte.

Das durch DHEA verursachte Abrunden der Zellen bedingt eine Aktivierung von Rho, die Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen eine Aktivierung der Rho-Kinase.

Die durch Stimulation mit DHEA beobachtete Bildung von Filopodien kann nicht durch die alleinige Aktivierung des Rho-Signalwegs erklärt werden. Die Bildung von Filopodien bedingt eine Aktivierung der Rho-GTPase Cdc42. Cdc42 induziert auch die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen entlang der Zellperipherie (Manser, 1995) (Dong J.-M. , 2002). Alle diese Effekte werden durch zahlreiche Effektoren wie N-WASP, PAK 4 (gegenläufig zu PAK1-3), ACK, p70 S6-Kinase und MRCKs weitergeleitet (Bishop, 2000). N-WASP bindet an Profilin, G-Aktin und den Arp2/3-Komplex und initiiert somit die Polymerisierung von Aktin, die zum Auswachsen von Filopodien unerlässlich ist (Bishop, 2000). Bei den MRCKs handelt es sich um Cdc42-bindende Serin/Threonin-Kinasen, die ebenfalls in die Aktinreorganisation und Bildung von Filopodien involviert sind. Des Weiteren sind neben den Rho-Kinasen auch die MRCKs in die Modulation von fokalen Adhäsionskomplexen involviert. Neben den Rho-Kinasen können auch die MRCKs die Phosphorylierung der MRLCs induzieren. Die Myosin-bindende Untereinheit (MBS) der Myosin-Phosphatase PP1 ist ein Substrat für die MRCKs und wird durch sie inhibiert. Dies führt dann zu einer erhöhten Aktin-Myosin-Interaktion und zur Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen (Bishop, 2000) (Dong J.-M. , 2002). Daher ist nicht ganz ausgeschlossen, dass dieser, durch Cdc42 vermittelte Signalweg, ebenfalls eine Rolle bei den durch DHEA induzierten Effekten spielt.

Zusammenfassend aktiviert DHEA in SH-SY5Y-Zellen den Rho-Signalweg. Diese Aktivierung führt letztendlich zu einer erhöhten Phosphorylierung der MRLC an Serin19. Die erhöhte Phosphorylierung der MRLC an Serin19 kann sowohl indirekt über eine Inhibierung der Myosin-Phosphatase induziert werden als auch direkt über eine Phosphorylierung der MRLCs durch die Rho-Kinase. Im ersten Fall führt eine Aktivierung der Rho-Kinase zu einer erhöhten Phosphorylierung der Myosin-bindenden Untereinheit der Myosin-Phosphatase PP1 und somit zu deren Inhibierung (Amano, 1996) (Kawano, 1999). Eine Kombination beider Wege kann nicht ausgeschlossen werden. Beides führt letztendlich zu einer erhöhten Phosphorylierung der MRLCs. Diese Effekte erhöhen dann die Myosin-Aktin-Interaktionen, die Zellen kontrahieren und es werden vermehrt Stressfasern und fokale Adhäsionskomplexe gebildet (Amano, 1998). Die Bildung der Filopodien wird dann vermutlich durch Cdc42 vermittelt. Die Effekte von DHEA werden durch die Inhibierung der

werden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass der Estrogenrezeptor Alpha mit einem G-Protein interagiert und es dann zu einer Aktivierung der GTPase RhoA und der nachfolgenden Rho-Kinase kommt (Simoncini, 2006). Die Effekte von Estradiol auf die Mikrotubuli und das Aktincytoskelett ähneln denen von DHEA stark. Somit unterstützen diese Ergebnisse meine Arbeit. In von mir durchgeführten Experimenten konnte ich zeigen, dass die Stimulation von SH-SY5Y-Zellen mit Estradiol sowohl zu einem Abrunden der Zellen als auch zur Ausbildung von Filopodien führte. Weitere Untersuchungen des Aktincytoskeletts ergaben, dass es nach Stimulation der Zellen mit Estradiol auch zu einer vermehrten Bildung von Stressfasern kam (Daten nicht gezeigt). Für Estradiol konnte der verantwortliche Rezeptor identifiziert werden. Für DHEA konnte noch kein eindeutiger Plasmamembranrezeptor identifiziert werden, dennoch häufen sich die Hinweise, dass es sich dabei ebenfalls um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor handelt. Die in dieser Arbeit bewiesene, durch DHEA induzierte Aktivierung des Rho-Signalwegs deutet ebenfalls auf einen G-Protein gekoppelten Mechanismus hin. Eine Bindung von DHEA an den Estrogenrezeptor alpha kann ebenfalls nicht ausgeschlossen. DHEA könnte die Aktivierung des Rho-Signalwegs auch über den Estrogenrezeptor alpha induzieren. Andere Arbeiten ergaben jedoch, dass die Effekte von DHEA nicht durch Inhibitoren des Estrogenrezeptors inhibiert werden konnten (Charalampopoulos, 2006) (Widstrom, 2004) (Liu D. , 2004). Diese Ergebnisse deuten wiederum auf einen DHEA-spezifischen Rezeptor hin, der dem Estrogenrezeptor aber strukturell ähnlich zu sein scheint.

Im Bereich der Androgene konnte für Aldosteron bewiesen werden, dass es in Zellen der glatten Muskulatur durch dieses Steroid zu einer Aktivierung der PI3-Kinase und zu einer Modulation der Phosphorylierung der MLCs und Kontraktion der Zellen kommt (Gros, 2006). Dies bestätigt wiederum meine Annahme, dass die Effekte von Testosteron über Induktion der PI3-Kinase zu einer Aktivierung des Rac-Signalwegs führen.

4.8 Aktinskelett vs. Mikrotubuli

Neben dem Aktincytoskelett spielen auch die Intermediärfilamente und Mikrotubuli eine wichtige Rolle bei der Bildung von Neuriten oder ähnlicher Zellausläufer. Den Untersuchungen des Aktinskeletts gingen zahlreiche Studien an Mikrotubuli voraus, daher sollten diese hier nicht außer Acht gelassen werden. In meiner Diplomarbeit wurden die Effekte zahlreicher Steroide in stabilisierend und destabilisierend eingeteilt. Testosteron zeigte dabei einen stabilisierenden Effekt und es kam zu einer starken Bündelung der Mikrotubuli in den auswachsenden Neuriten. Den entgegengesetzten Effekt zeigte DHEA, hier kam es zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli. Auch in diesem Bereich geben immer mehr veröffentlichte Studien den Hinweis, dass die Rho-GTPasen auch die Assemblierung und Deassemblierung von Mikrotubuli beeinflussen. So bestätigte sich z.B., dass die Aktivierung und Inaktivierung von p160ROCK zu einer Deassemblierung und Assemblierung der Mikrotubuli führt (Sayas, 2002) und dass die Deassemblierung der Mikrotubuli mit einer

gesteigerten Phosphorylierung der MRLCs gekoppelt ist (Kolodney, 1995). Mikrotubuli-depolymerisierende Substanzen, wie z.B. Colchicin, führen zu einer vermehrten Bildung von Stressfasern. Dabei geht man von einem Signalweg von den Mikrotubuli zu Rho aus, ein Signalweg von Rho zu den Mikrotubuli konnte, bis auf die Studien an p160ROCK, noch nicht nachgewiesen werden. In SH-SY5Y-Zellen induziert LPA Veränderungen in der Dynamik von Mikrotubuli über eine Beeinflussung von Mikrotubuli-Elementen, wie Tubulin oder auch MAPs. Dies führt zu einem Rückgang von stabilen Mikrotubuli. Des Weiteren fördert LPA die Hyperphosphorylierung von einigen axonalen MAPs (MAP1B und Tau), dies führt wiederum zu einer Destabilisierung von Mikrotubuli. Die Hyperphosphorylierung von Tau erfolgt über die GSK-3, die durch LPA aktiviert wird. Dieser Weg scheint eine wichtige Rolle bei der Mitose von Neuroblasten und beim Zurückziehen von Neuriten in differenzierten Neuronen zu spielen. Ebenso könnte dieser Weg eine wichtige Rolle in der Hyperphosphorylierung von Tau spielen, die bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen auftritt (Sayas, 2002). Diese und meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass Rho in neuronalen Zellen das Aktinskelett und die Mikrotubuli simultan reguliert.

4.9 Expression und Lokalisation der regulatorischen leichten Ketten (MRLCs) von Myosin II in SH-SY5Y Neuroblastomazellen

Die Untersuchungen der MRLCs in SH-SY5Y-Zellen haben ergeben, dass insgesamt drei Isoformen der MRLC in diesem neuronalen Zelltyp exprimiert werden. Die Expressionsrate dieser Isoformen hängen dabei vom Grad der Differenzierung ab. Die Expressionsrate steigt mit dem Grad der Differenzierung der Zellen an. Des Weiteren beobachtete ich, dass die Expression der einzelnen Isoformen von der Kompartimentierung abhängig ist. Während in der Kern- und Cytoskelett-Fraktion nur eine einzige Isoform exprimiert wird, werden in der Cytosol- und Membran-Fraktion in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums bis zu drei Isoformen exprimiert. Bislang konnten mit Hilfe der eindimensionalen SDS-PAGE in HeLa-Zellen nur zwei Isoformen der MRLC (bei 24 und 22 kDa) identifiziert werden (Geraschenko, 2002). Die Spezifität des in dieser Arbeit verwendeten Antikörpers (Anti-MLC) wurde von mir eindeutig bestätigt. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde auch mehrfach in der Literatur bestätigt (Knapp, 1999) (Silverman-Gavrila, 2003).

In der Cytosol- und Membran-Fraktion beobachtete ich eine veränderte Expressionsrate der MRLCs in Abhängigkeit der verwendeten Steroide. Dass Steroide die Expression von Myosin-Untereinheiten modulieren, konnte bereits für Zellen der glatten Muskulatur gezeigt werden (Calovini, 1995) und soll hier nicht diskutiert werden.

Als interessant stellte sich die Untersuchung der 18 kDa Isoform in der Kern- und Cytoskelett-Fraktion im hochdifferenzierten Stadium der Zellen heraus. Die Stimulation der Zellen mit den verwendeten Steroiden führte zu einer veränderten Verteilung der MRLCs zwischen beiden Kompartimenten. Die mittels IP gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass es

sich bei dieser 18 kDa Isoform um die durch DHEA an Serin 19 phosphorylierbare MRLC handelt. Aufgrund der untersuchten Fraktionen gehe ich von einer Umverteilung aus, da eine de novo Proteinbiosynthese im Kern ausgeschlossen werden kann. Durch die Stimulation der Zellen mit Testosteron kam es zu einer Umverteilung der 18 kDa Isoform vom Cytoskelett in den Bereich des Kerns. Dies wurde auch mittels Immunfluoreszenz bestätigt. Identische Effekte beobachtete ich auch nach der Stimulation mit dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation der Zellen mit DHEA zu einer Umverteilung der MRLCs in die Cytoskelett-Fraktion. Diese Umverteilung hatte eine Abnahme der MRLCs im Kern zur Folge. Auch dieses Ergebnis konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz bestätigt werden.

Zunächst war es sehr überraschend, MRLCs im Zellkern zu detektieren. Jedoch konnte anhand von Markerproteinen gezeigt werden, dass die einzelnen Fraktionen nicht durch Proteine anderer Kompartimente verunreinigt waren. Zahlreiche Arbeiten anderer Arbeitsgruppen bestätigten das Auftreten von MRLCs im Zellkern. Dabei handelt es sich um mono- oder diphosphorylierte Formen der MRLC. Die Funktion der Lokalisierung im Kern ist bis heute unbekannt (Saitoh, 2001) (Ueda, 2002) (Conway, 2004).

Neuere Studien belegen, dass β -Aktin im Zellkern vorkommt und essentiell für die Transkription durch RNA-Polymerasen ist. β -Aktin bindet an die RNA-Polymerase I, II und III (Lanerolle, 2005) und ist wichtig für die Bildung des Initiationskomplexes (Hofmann, 2004). Des Weiteren stellt Aktin eine Komponente des Chromatin-Remodeling-Komplexes dar und ist essentiell für den nukleären Transport von Proteinen und RNA (Lanerolle, 2005). In jüngster Zeit wurde auch erstmals die Existenz von F-Aktin im Kern nachgewiesen. Dennoch sollen diese Polymere sich deutlich von Stressfasern, wie sie im Cytosol vorkommen, unterscheiden (McDonald, 2006).

Die mit Aktin assoziierten Proteine ARPs und Profilin sind ebenfalls im Kern zu finden. Die Induktion von Stress soll die Translokation von Aktin in den Kern begünstigen. Cofilin konnte als aktiver Carrier von Aktin identifiziert werden. Cofilin wandert nach Dephosphorylierung in den Kern und wird dort mit Aktin colokalisiert (Bettinger, 2004). Der Export von Aktin verläuft über Kern-Export-Signale, die in α -, β - und γ -Aktin hoch konserviert sind (Wada, 1998). Weiterhin unklar ist die Interaktion von nukleärem Aktin und Myosin. Im Zellkern fand man eine Isoform von Myosin I (Pestic-Dragovich, 2000). Nucleäres Myosin I ist im Gegensatz zu Myosin II ein unkonventionelles Myosin und formt keine Filamente (Brown, 2004). Dies bedeutet, dass die klassische Aktin-Myosin-Interaktion nicht stattfinden kann.

Eine Veränderung der Aktin-Dynamik im Cytoplasma beeinflusst die Transkription durch Regulierung der Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Kern (Miralles, 2003). Die Lokalisation der MRLCs im Kern könnte den Sinn haben, dass auch sie als Transkriptionsfaktoren agieren. Eine Veränderung der Aktin-Dynamik könnte somit auch die Translokation der MRLCs beeinflussen. Die von mir in dieser Arbeit untersuchten Steroide beeinflussen die Aktin-Dynamik sehr deutlich. Des Weiteren wurde für Testosteron eine erhöhte Translokation der MRLCs in den Kern beobachtet. Im Gegensatz dazu, induzierte

DHEA einen vermehrten Export der MRLCs aus dem Kern in den Bereich von Cytoskelett-Komponenten. Diese Translokation betrifft lediglich die durch DHEA an Ser19 phosphorylierbare Isoform der MRLCs. Bei Cofilin dient der Phosphorylierungsstatus als Signal für die Translokation dieses Proteins in den Zellkern (Bettinger, 2004). Überträgt man dieses Prinzip auf die MRLCs, könnte der Phosphorylierungsstatus der MRLCs über eine Translokation in den Zellkern entscheiden. Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen, führt dann eine erhöhte Phosphorylierung der MRLCs in ausdifferenzierten neuronalen Zellen zu einem Export von MRLCs aus dem Zellkern und eine verminderte Phosphorylierung zu einer Translokation der MRLCs in den Zellkern. In Kopplungsversuchen beobachtete ich, dass die MRLC sowohl in ihrer monomeren Form als auch in Form von Dimeren im Kern vorkommen. Es wurden einige klassische Aktin-bindende Proteine (aus dem Cytoplasma) im Kern nachgewiesen (Bettinger, 2004). Somit könnten auch die MRLCs, als Monomere und Dimere, die Transkription selbst, den Transport von Transkriptionsfaktoren oder auch das Chromatin-Remodeling beeinflussen. Eine Reorganisation des cytoplasmatischen Aktinskeletts würde dann die Genexpression (besonders cytoskelettaler Elemente) direkt beeinflussen.

Die Aktin-Myosin Interaktion wird in neuronalen Zellen wesentlich durch die Aktivität der Myosin-Phosphatase reguliert. Bei der Myosin-Phosphatase handelt es sich um ein Holoenzym, das aus drei Untereinheiten, einer katalytischen Untereinheit PP1C, einer Myosin-bindenden 130 kDa Untereinheit (M130) und einer 20 kDa Untereinheit, besteht (Brozovich, 2002). In Zellen der glatten Muskulatur wird aktiviertes Rho in die Peripherie der Zelle transportiert. Dieser Transport korreliert dann mit einer Aktivierung der Rho-Kinase und der anschließenden Phosphorylierung und Inhibierung der Myosin-Phosphatase. Dies führt dann zu einer erhöhten Phosphorylierung der MRLCs in der kortikalen Region (Miyazaki, 2002). Die Phosphorylierung der Myosin-Phosphatase an Thr697 induziert ebenfalls einen Transport der Myosin-Phosphatase in die kortikale Region. Nach diesem Transport kommt es dann zu einer Abdissoziation der katalytischen Untereinheit, wobei dann die Aktivität des Enzyms inhibiert wird. Dieser Effekt kann durch den Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 inhibiert werden (Shin, 2002). Somit kann bei der Aktivierung des Rho-Signalwegs durch DHEA von einem zielgerichteten Transport der MRLCs in die kortikale Region der Zelle ausgegangen werden. Dieser Transport wird durch die mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz erhaltenen Ergebnisse bestätigt. Dort kommt es dann zu den oben beschriebenen Effekten und der Colokalisation der MRLCs mit den Aktinfilamenten.

Nun stellt sich die Frage, in welcher Region die Myosin-Phosphatase ohne Agonist-induzierte Rho-Aktivierung lokalisiert ist. Untersuchungen an Zellen der glatten Muskulatur (VSMC) und Fibroblasten ergaben, dass Myosin und die Untereinheiten der Myosin-Phosphatase unterschiedlich lokalisiert sind. Interessanterweise waren die katalytische Untereinheit PP1C und die Myosin-bindende Untereinheit M130 auch im Kern lokalisiert (Murata, 1997). Geht man davon aus, dass ein durch Rho induzierter Transport der Myosin-Phosphatase in die kortikale Region der Zelle zu einer Abdissoziation der Untereinheiten

und somit zur Inhibierung führt, könnte im Gegensatz dazu, die Lokalisation der Untereinheiten im Kern zu einer Aktivierung der Myosin-Phosphatase beitragen. Dies kann eine Erklärung dafür sein, warum es durch die Stimulation der Zellen mit Testosteron zu einem vermehrten Transport der MRLCs in den Kern kommt. Testosteron inhibiert den Rho-Signalweg. Testosteron würde dann den Transport der MRLC in den Kern induzieren, in dem es dann zu einer Bindung an die Myosin-Phosphatase kommt und die MRLCs vermehrt dephosphoryliert werden. Dies führt dann zur verminderten Aktin-Myosin Interaktion und zum Auswachsen von Neuriten.

4.10 Funktionalität, Transport und Lokalisation des Steroidhormonderivats DHEA-Bodipy

Mit der Synthese von DHEA-Bodipy konnte ein stabiles und funktionales fluoreszierendes Steroidhormon-Derivat entwickelt werden. Bei den Funktionalitäts- und Charakterisierungstests erwies sich die „Pseudopeptidbindung“ zwischen Steroid und Farbstoff als sehr stabil, besonders unter oxidativen Bedingungen. Der Synthese mittels Pseudopeptidbindung waren zahlreiche andere Synthesen mit verschiedenen Bindungstypen vorausgegangen. Bindungstypen wie z.B. Ester- und Etherbindungen erwiesen sich unter oxidativen Bedingungen als instabil.

Die von mir durchgeführten zahlreichen Funktionalitätstests konnten bestätigen, dass das Steroidderivat DHEA-Bodipy funktional ist. Die Stimulation von SH-SY5Y-Zellen mit DHEA-Bodipy führt zu einer vergleichbar starken Aktivierung des ER α und weist die gleichen antiapoptotischen Effekte wie DHEA auf. DHEA-Bodipy induziert auch die Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen, sowie das Abrunden der Zellen und die Ausbildung von Filopodien. Mit Hilfe dieses Steroid-Derivats konnte erstmals die subzelluläre Lokalisation von DHEA in neuronalen Zellen untersucht werden. Durch Colokalisationsexperimente wurde die Lokalisation von DHEA in den Mitochondrien beobachtet. Diese Ergebnisse wurden durch eine zusätzliche Immundetektion bestätigt. Der Transport von DHEA in die Mitochondrien erfolgt sehr rasch und der Zeitverlauf ist abhängig von der eingesetzten Konzentration des Steroids. Zusätzlich konnte mit Hilfe von DHEA-Bodipy gezeigt werden, dass die Bildung von Stressfasern von der Lokalisation des Steroids in den Mitochondrien abhängig ist. Die Bildung von Filopodien erfolgt noch vor der Lokalisation des Steroids in den Mitochondrien.

Die Lokalisation des Steroids in den Mitochondrien schließt jedoch einen G-Protein gekoppelten Mechanismus der Steroidwirkung nicht aus. Aufgrund der relativ schwachen Fluoreszenz des DHEA-Bodipy und der vermutlich geringen Rezeptordichte war jedoch keine Markierung der Plasmamembran detektierbar. Der Nachweis von DHEA über den DHEA-Antikörper führte hingegen zu einer zusätzlichen Markierung der Plasmamembran. Die Funktionalitätstests mit dem Luciferase-Reporter-Konstrukt bestätigten eindeutig, dass es durch DHEA zu einer Aktivierung des ER α kommt. Grundlage dieser Tests war die von

S.J. Webb zeigte die Tatsache, dass DHEA den ER α und den ER β aktivieren kann (Webb, 2006). In dem von mir durchgeführten Luciferase-Test führte die Stimulation der Zellen mit DHEA und DHEA-Bodipy zu einer stärkeren Aktivierung des ER α als durch 17 β -Estradiol.

Neueste Studien belegen, dass nukleäre Glucokortikoid-, Estrogen-, Androgen-, und Thyroid-Hormon Rezeptoren in den Mitochondrien verschiedenster Zelltypen vorkommen. Glucokortikoid- und Estrogen-Rezeptoren wurden bereits in Mitochondrien neuronaler Zellen entdeckt. Bei den Estrogen-Rezeptoren handelt es sich um den ER α und den ER β . In einigen Zelltypen konnten beide Formen in den Mitochondrien lokalisiert werden. In den meisten Zelltypen und auch Neuronen ist der ER β die dominierende Form in den Mitochondrien. Der ER α ist dagegen die dominierende Form im Zellkern. Beide Rezeptoren sind physiologisch aktiv, zeigen aber eine sehr unterschiedliche, gewebsspezifische Verteilung und Gen-Aktivierung. Steroid-Hormone sind wichtige Regulatoren des Energie-Stoffwechsels, da sie die Transkription und Biosynthese von OXPHOS Genen sowohl im Kern als auch (neue Studien) in den Mitochondrien modulieren. Die mitochondrialen Sequenzen der HREs sind mit den Kernsequenzen identisch. Somit ergibt sich eine parallel koordinierte Expression von nukleären und mitochondrialen OXPHOS Genen durch Steroid-Hormone. Neben dem Energie-Stoffwechsel spielen Mitochondrien auch eine wichtige Rolle bei apoptotischen und antiapoptotischen Signalen. Es häufen sich immer mehr die Hinweise, dass die apoptotischen oder antiapoptotischen Effekte von Hormonen über die entsprechenden mitochondrialen Rezeptoren vermittelt werden. Dabei ist zu betonen, dass ein und dasselbe Hormon, abhängig vom Zelltyp, einmal apoptotisch und einmal antiapoptotisch wirken kann. Dies hängt von der Komposition mitochondrialer Proteine ab, die in verschiedenen Zelltypen stark variiert (Psarra, 2008). Estrogen-Rezeptoren sind somit in der Plasmamembran, dem Zellkern und in den Mitochondrien lokalisiert (Evinger, 2005). Neuere Studien belegen sogar, dass in neuronalen Zellen der ER β , der eine hohe Affinität für DHEA zeigt, ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist. Ein Transport dieses Rezeptors in andere Organellen oder den Zellkern wird ausgeschlossen (Yang, 2004). Eine Bindung von DHEA-Bodipy an den ER β würde somit zur beobachteten Fluoreszenzmarkierung der Mitochondrien führen. In neuronalen Zellen wirken Estrogene antiapoptotisch. Dabei geht man von einer direkten Bindung des ER β an die mitochondriale DNA und die nachfolgende erhöhte Expression von OXPHOS Genen aus. Die Effekte von 17 β -Estradiol und DHEA ähneln sich sehr stark. Bei beiden Steroiden kommt es morphologisch zum Abrunden der Zellen, zur Ausbildung von Filopodien und Stressfasern. Des Weiteren konnte für einen membranständigen ER α -Rezeptor eine Aktivierung des Rho-Signalwegs gezeigt werden (Simoncini, 2006).

Die Ergebnisse meiner Arbeit bestätigen auch eine Beteiligung des Rho-Signalwegs für DHEA. Des Weiteren wirkt auch DHEA in neuronalen Zellen antiapoptotisch. Hinsichtlich der Aktivierung des Rho-Signalwegs bin ich davon überzeugt, dass es entweder ein für DHEA spezifisches G-Protein gekoppelten Rezeptor gibt oder DHEA seine Wirkung über eine Bindung an einen ER oder strukturell verwandten Rezeptor induziert.

4.11 Die Rolle von Rho-GTPasen in neurodegenerativen Erkrankungen

Die Morphologie von Neuronen bildet die Basis für die Ausbildung eines sehr komplexen Netzwerks im Gehirn, das den Informationsfluss für Lernprozesse und Erinnerung gewährleistet. Rho-GTPasen spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Funktionalität von Neuronen, besonders über die Regulierung des neuronalen Cytoskeletts. Die Wichtigkeit der Rho-GTPasen in Entwicklung und Funktion von Neuronen wird besonders deutlich bei der Betrachtung assoziierter neurodegenerativer Erkrankungen. Mutationen in Genen, die für Regulatoren oder Effektoren des Rho-GTPase-Signalwegs kodieren, führen zur Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. MR (mental retardation) oder ALS (Govek, 2005).

MR tritt bei 2-3% der Kinder und jungen Erwachsenen auf. Die Krankheit ist charakterisiert durch reduzierte kognitive Funktionen, die sich in einem IQ unter 70 und Defizite in angepasstem Verhalten äußern. Die zugrundeliegenden Ursachen sind sehr heterogen und schließen nicht-genetische Faktoren wie Infektionen, Frühgeburt und Alkoholmissbrauch während der Schwangerschaft mit ein. Mutationen in Rho-assoziierten Genen führen zu einer Unterbrechung der normalen neuronalen Entwicklung, Struktur und Plastizität neuronaler Netzwerke durch Störungen der Aktincytoskelett-Regulierung. Dies äußert sich dann in Abnormitäten der Morphologie von Neuronen und führt letztendlich zu den oben beschriebenen Charakteristika dieser Krankheit.

Auch bei der ALS-Erkrankung spielen Defekte im Rho-GTPase-Signalweg eine wichtige Rolle. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer progressiven Zerstörung von Motorneuronen, die sich letal auswirkt. Ursächlich für die ALS-Erkrankung sind Mutationen auf zwei Genen. Eines dieser Gene (ALS2) kodiert das Protein Alsln. Bei Alsln handelt es sich um einen Rho-GTPase-Austauschfaktor, hauptsächlich für Rac1. Nach heutigem Stand der Forschung ist nicht bekannt, wie sich die Austausch-Aktivität von Alsln auf die Funktion oder das Überleben von Motor-Neuronen auswirkt (Govek, 2005).

Bei der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer kommt es ebenfalls zu Abnormitäten des neuronalen Cytoskeletts. Zu den pathologischen Befunden des Morbus Alzheimer und auch anderer neurodegenerativer Erkrankungen gehören sogenannte „Hirano-bodies“. „Hirano-bodies“ sind cytoplasmatische Einschlüsse, in denen vermehrt aggregiertes F-Aktin eingelagert wird (Galloway, 1987). Des Weiteren wurde aggregiertes Aktin auch in sogenannten „cofilin-actin-rods“ gefunden werden. Hierbei handelt es sich ebenfalls um Einschlüsse, die man in hippocampalen und kortikalen Neuronen von Alzheimer Patienten (post-mortem) identifiziert hat (Milamide, 2000). Beim Morbus Alzheimer kommt es zu einem Verlust an dendritischen Verknüpfungen und synaptischen Interaktionen (Masliah, 1995). In diesen Bereichen spielt die Regulierung der Polymerisierung von Aktin eine sehr entscheidende Rolle. Diese Regulation wird über die Rho-GTPasen gesteuert. Neuronen von Alzheimer Patienten zeigen erheblich erhöhte

Mengen und Aktivitäten von Rac/Cdc42 und cytoskelettale Abnormitäten (Zhu, 2000). In hippocampalen Neuronen beobachtete man eine durch A β 1-42 induzierte Erhöhung der Rac1/Cdc42-Aktivität und eine gesteigerte Polymerisierung von Aktin. Die durch die fehlregulierte Rac1/Cdc42-Aktivität erhöhte Aktin-Dynamik könnte der Grund für die Aggregation von F-Aktin in den sogenannten „Hirano-bodies“ sein (Mendoza-Naranjo, 2007).

Die neuroprotektiven Eigenschaften von DHEA könnten u.a. durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Aktivierung des Rho-Signalwegs begründet sein. Im Rahmen der Alzheimerschen Erkrankung könnte eine Aktivierung des Rho-Signalwegs durch DHEA der Aggregation von F-Aktin entgegenwirken und somit Neuronen vor cytoskelettalen Abnormitäten schützen. A β destabilisiert die Calcium-Regulation in Neuronen und führt zu einer Sensibilisierung der Neuronen auf externe Stimuli, die die intrazelluläre Calcium-Konzentration beeinflussen (Mattson, 1993). Eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration induziert die Aktivierung von Rac1 und Tiam1 (Flemming, 1998) (Price, 2003). In Abschnitt 4.6 wurde die Hypothese aufgestellt, dass DHEA neben der Aktivierung des Rho-Signalwegs durch ein Absenken des intrazellulären Calcium-Spiegels zu einer Inhibierung des Rac-Wegs führt. Es ist bekannt, dass Veränderungen des Aktincytoskeletts einen Einfluss auf die Aktivität spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle und NMDA-Rezeptoren haben (Westbrook, 1993) (Teichberg, 1998). Die Aktivität des NMDA-Rezeptors wird durch die MLCK (Lei, 2001) und Rho (Stull, 2001) moduliert. David Amaran und Kollegen veröffentlichte 2005 eine Arbeit, die bestätigte, dass die MRLCs in Neuronen direkt mit dem NMDA-Rezeptor interagieren (Amaran, 2005). DHEA könnte nun über die Aktivierung des Rho-Signalwegs, der damit verbundenen Phosphorylierung der MRLCs und der daraus folgenden Modulation des NMDA-Rezeptors regulierend auf die Calciumhomeostase einwirken. Eine Feinabstimmung dieser Regulation schließt auch die von mir postulierte Aktivierung von Cdc42 durch DHEA mit ein. Die Aktivierung von Cdc42 könnte einer Überregulierung des Rho-Signalwegs entgegenwirken. Die neuroprotektive Wirkung bestimmter Neurosteroide kann meinen Ergebnissen zur Folge auch auf ihren Einfluss auf das neuronale Cytoskelett zurückzuführen sein. Dies bedeutet zum Einen, dass eine fehlregulierte Neurosteroidogenese, aber auch der Einsatz von Hormontherapien und der Mißbrauch von Steroiden (Anabolika) zur Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen führen kann. Zum Anderen ergeben sich durch diese Erkenntnisse auch Ansätze für therapeutische Maßnahmen zur Bekämpfung neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. dem Morbus Alzheimer.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zum heutigen Stand der Forschung sind die morphologischen Effekte von Neurosteroiden auf das neuronale Cytoskelett und die involvierten Signalkaskaden noch weitgehend unerforscht. In diesem Zusammenhang stellen sich auch die Fragen nach den verantwortlichen Rezeptoren und dem Transportmechanismus sowie die subzelluläre Lokalisation der Steroide.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Steroide DHEA und Testosteron eine Reorganisation des Aktincytoskeletts in neuronalen Zellen induzieren und dass diese Effekte diesen Steroiden und nicht ihren Folgemetaboliten zuzuordnen sind. DHEA bewirkt die Kontraktion der Zellen, eine erhöhte Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen sowie die Bildung von Filopodien. Der diesen Effekten zu Grunde liegende Signalweg konnte eindeutig identifiziert werden. DHEA induziert in neuronalen Zellen die Aktivierung des Rho-Signalwegs. Diese Aktivierung führt zu einem erhöhten Phosphorylierungsstatus der regulatorischen leichten Kette von Myosin II (MRLC) an Serin 19 und der damit verbundenen erhöhten Myosin-Aktin-Interaktion. Die Ausbildung von Filopodien wird vermutlich über eine Aktivierung der GTPase Cdc42 vermittelt.

Testosteron induziert das Auswachsen langer Neuriten sowie eine Verminderung von Stressfasern in neuronalen Zellen. Diese Effekte sind abhängig von der Aktivität der PI3-Kinase. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Testosteron über die PI3-Kinase und FAK den Rac-Signalweg induziert, da es zu einer Inhibierung des Rho-Signalwegs kommt. Zahlreiche Erkenntnisse deuten darauf hin, dass DHEA und Testosteron die Aktivierung der beteiligten Signalwege über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor induzieren. In diesem Zusammenhang sollte durch weitere Forschungsarbeit geklärt werden, ob die beteiligten RhoGTPase-Signalwege über einen G-Protein gekoppelten Mechanismus aktiviert werden.

Die Synthese eines funktionalen, fluoreszierenden DHEA-Derivats (DHEA-Bodipy) ermöglichte erstmals, den Transport und die subzelluläre Lokalisation von DHEA in neuronalen Zellen zu beobachten. DHEA-Bodipy wird in neuronalen Zellen in den Mitochondrien lokalisiert. Diese Lokalisation ergibt völlig neue Ansätze im Verständnis zellulärer Wirkungsorte von Steroiden und beteiligter Rezeptoren.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung von Steroiden bietet vielfältige Möglichkeiten im Einsatz zellbiologischer Methoden. Nach diesem Verfahren hergestellte, fluoreszierende Steroide eignen sich aufgrund ihrer Stabilität sehr gut für die Untersuchung des Transports und die subzelluläre Lokalisation von Steroiden an fixierten und lebenden Zellen sowie für Colokalisationsexperimente. Diese Methode grenzt somit auch die Anzahl möglicher molekularer Interaktionspartner ein.

Für Testosteron konnte ebenfalls ein fluoreszierendes Testosteron-Derivat (Testosteron-Bodipy) synthetisiert werden. Geeignete Funktionalitätstest und die Untersuchung von Transport und Lokalisation des Steroids sollten folgen.

Die Aufklärung der Effekte von Steroiden auf das neuronale Cytoskelett und der beteiligten Signalkaskaden sowie die Identifizierung der zellulären Wirkungsorte ermöglichen therapeutische Ansätze zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, deren Ursachen in Abnormitäten des Cytoskeletts oder fehlregulierter Neurosteroidogenese zu begründen sind.

Abo, A. (1998). PAK4, a novel effector for Cdc42, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J.* 17, S. 6527-6540.

Adelstein, C. K. (1981). Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* 256, S. 7501-7509.

Amano, M. (1998). Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-Kinase. *Genes Cells*, S. 177-188.

Amano, M. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem* 271, S. 20246-20249.

Amparan, D. (2005). Direct interaction of myosin regulatory light chain with the NMDA receptor. *Journal of Neurochemistry* 25, S. 349–361.

Azcoita, I. (2001). Brain aromatase is neuroprotective. *J. Neurobiol.* 47, S. 318-329.

Baas, P. a. (1990). Individual microtubules in the Axon consist of domains that differ in both composition and stability. *J. Cell Biol.* 111, 495-509.

Baulieu, E.-E. (1998). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosteron sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Vol.95*, S. 4089-4091.

Bernhardt, R. a. (1984). Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J. Comp. Neurol.* 226, 203-211.

Bettinger, B. T. (2004). Actin up in the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, S. 410-415.

Bishop, A. L. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348, S. 241-255.

blackwellpublishing.

von blackwellpublishing.com/11thhour/matt/about/u1ch2b.html abgerufen

Bresnick, A. (1999). Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, S. 26-33.

Bretscher, A. (1999). Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, S. 109-116.

Bridgman, J. B. (2003). Role of Myosin II in Axon Outgrowth. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 51, S. 421-428.

Brown, M. E. (2004). Myosin Function in Nervous and Sensory Systems. *J. Neurobiol.* 58, S. 118-130.

- Brozovich, F. V. (2002). Myosin Light Chain Phosphatase. *Circ Res.* 90 , S. 500-502.
- Brzeska, H. (2004). Rac-induced increase of phosphorylation of myosin regulatory light chain in HeLa cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 58 , S. 186-199.
- Burgoyne, R. a. (1984). Ontogeny of microtubule-associated protein 2 in rat cerebellum: differential expression of the doublet polypeptides. *Neuroscience* 11, 157-167 .
- Burridge, K. (2004). Rho and Rac Take Center Stage. *Cell* 116 , S. 167-179.
- Calovini, T. (1995). Steroid-Hormone Regulation of myosin Subunit Expression in Smooth and Cardiac Muscle. *Journal of Cellular Biochemistry* 59 , S. 69-78.
- Charalampopoulos, I. (2004). Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *PNAS* 101 , S. 8209-8214.
- Charalampopoulos, I. (2006). Neurosteroids as Endogenous Inhibitors of Neuronal Cell Apoptosis in Aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1088 , S. 139–152.
- Chew, T. (1998). Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (PAK). *Muscle Res. Cell Motil.* 19 , S. 839-854.
- Compagnone, N. A. (2000). Neurosteroids: Biosynthesis and Function of these novel Neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology* , S. 1-56.
- Conway, A. M. (2004). Regulation of myosin light chain phosphorylation by RhoB in neuronal cells. *Experimental Cell Research* 300 , S. 35-42.
- Daniels, R. (1998). Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J.* 17 , S. 754-764.
- Davies, S. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* 351 , S. 95-105.
- Doherty, P. (2000). CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. *Mol. Cell Neurosci.* 16 , S. 283-295.
- Dong, J. (1998). cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J. Biol. Chem.* 273 , S. 22554-22562.

- Dong, J.-M. (2002). Cdc42 antagonizes inductive action of cAMP on cell shape, via effects of thymotonic dystrophy kinase related light chain phosphorylation. *European Journal of Cell Biology* 81 , S. 231-242.
- Duffel, M. W. (2003). Enantioselectivity of human hydroxysteroid sulfotransferase ST2A3 with naphthyl-1-ethanols. *Drug Metabolism and Disposition* , S. 697-700.
- E.Nogales. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69, 277-302 .
- Edwards, D. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1 , S. 253-259.
- Elkin, P. C. (2000). Axonal myosins. *Journal of Neurocytology* 29, 831–841 .
- Estrada, M. (2006). Ca²⁺ oscillations induced by testosterone enhance neurite outgrowth. *J. of Cell Sci.* 119 , S. 733-743.
- Estrada, M. (2003). Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 144 , S. 3586-3597.
- Evinger, A. (2005). Requirements for estrogen receptor alpha membrane localization and function. *Steroids* 70 , S. 361-363.
- Falkenstein, E. (2000). Multipel Actions of Steroid Hormones - A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. *Pharmacol. Rev.* 52 , S. 513-555.
- Feng, J. (1999). Inhibitory Phosphorylation Site for Rho-associated Kinase on Smooth Muscle Myosin Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 274 , S. 37385-37390.
- Flemming, I. (1998). Phospholipase C-gamma, protein kinase C and Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II are involved in platelet-derived growth factor-induced phosphorylation of Tiam1. *FEBS Lett.* 429 , S. 229-233.
- Ford, H. L. (1997). Effect of Mts1 on the Structure and Activity of Nonmuscle Myosin II. *Biochemistry* 36 , S. 16321-16327.
- Fujita, A. (2001). NGF induces neurite outgrowth via a phosphorylation of myosin light chain in PC 12 cells. *NeuroReport* 12 , S. 3599-3602.
- Galloway, P. (1987). Hirano body filaments contain actin and actin-associated proteins. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46 , S. 185-199.
- Garcia-Segura, L. M. (2003). Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog. in Neurobiol.* 71 , S. 31-41.

- Georgiev, D. D. (2004). Neuronic System Inside Neurons: Molecular Biology and Biophysics of neuronal Microtubules.
Biomedical Reviews; 15: 67-75 .
- Geraschenko, B. I. (2002). Phosphorylation at Threonine-18 in Addition to Phosphorylation at Serine-19 on Myosin-II Regulatory Light Chain Is a Mitosis-Specific Event.
Cytometry 47 , S. 150-157.
- Gilmore, K. B. (1997). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.
Nature (London) 381 , S. 531-535.
- Godin, C. (1999). Separation by thin-layer chromatography of the most common androgen-derived C19 steroids formed by mammalian cells.
Steroids 64 , S. 767-769.
- Gouras, G. (2000). Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's beta-amyloid peptides.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 , S. 1202-1205.
- Govek, E.-E. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development.
Genes and Dev. 19 , S. 1-49.
- Grafstein, B. a. (1980). Intracellular transport in neurons.
Physiol. Rev. 60, 1167-1283 .
- Grant, J. (1990). Mammalian nonsarcomeric myosin regulatory light chains are encoded by two differentially regulated and linked genes.
J. Cell. Biol. 111 , S. 1127-1135.
- Gros, R. (2006). Rapid Effects of Aldosterone on Clonal Human Vascular Smooth Muscle Cells.
Am. J. Physiol. Cell Physiol.
- Hartwig, J. (1995). Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets.
Cell 82 , S. 643-653.
- Heinlein, C. A. (2002). The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions.
Molecular Endocrinology 16 , S. 2181-2187.
- Hirokawa, N. (1991). Molecular architecture and dynamics of the neuronal cytoskeleton.
In The Neuronal Cytoskeleton. R. D. Burgoyne (ed.). Wiley-Liss, New York. pp. 5-74.
- Hirose, M. (1998).
J. Cell Biol. 141 , S. 1625-1636.
- Hirose, M. (1998). Molecular Dissection of the Rho-associated Protein Kinase (p160ROCK)-regulated Neurite Remodeling in Neuroblastoma N1E-115 Cells.
J. Cell Biol. 141 , S. 1625-1636.
- Hodge, T. (1992). Role of the COOH-terminal nonhelical tailpiece in the assembly of a vertebrate nonmuscle myosin rod.
J. Cell Biol. 118 , S. 1085-1095.

- Hofmann, W. (2004). Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transkription by RNA polymerase II.
Nat. Cell Biol. 6 , S. 1094-1101.
- Hollenbeck, P. (2001). Cytoskeleton: Microtubules get the signal.
Curr. Biol. 11 , S. 820-823.
- Ikebe, M. (1988). Effects of phosphorylation of light chain residues threonine 18 and serine 19 on the properties and conformation of smooth muscle myosin.
J. Biol. Chem. 263 , S. 6432-6437.
- Ikebe, M. (1986). Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-Dalton light chain of smooth muscle myosin.
J. Biol. Chem 261 , S. 36-39.
- Ikebe, M. (1985). Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase.
J. Biol. Chem. 269 , S. 10027-10031.
- Ikebe, M. (1987). Phosphorylation of the 20,000-Dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase.
J. Biol. Chem 262 , S. 9569-9573.
- Ishizuka, T. (1999). DHEA improves glucose uptake via activations of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase.
Am. J. Physiol. 276 , S. 196-204.
- Jensen, E. (1996). Steroid hormones, receptors and antagonists.
Ann. NY Acad. Sci. 748 , S. 1-17.
- Kaasik, A. (2003). Dehydroepiandrosterone with other neurosteroids preserve neuronal mitochondria from calcium overload.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 87 , S. 97-103.
- Kampa, M. (2004). The opioid agonist ethylketocyclazocine reverts the rapid, non-genomic effects of membrane testosterone receptors in the human prostate LNCaP cell line.
Experimental Cell Research 294 , S. 434– 445.
- Kato, S. (2000). Molecular mechanisms of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways.
Genes Cells 5 , S. 593-601.
- Katoh, K. (2001). Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts.
Am J Physiol Cell Physiol 280 , S. 1669-1679.
- Kawano, Y. (1999). Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo.
J. Cell Biol. 147 , S. 1023-1038.
- Kendrick-Jones, S. C. (kein Datum). Regulation of Non-muscle Myosin Structure and Function.
BioEssays, Review Articles Vol. 7, No.4 .

- Kimura, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase).
Science 273 , S. 245-248.
- Kitazawa, T. (2000). Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility.
J. Biol. Chem. 266 , S. 9897-9900.
- Knapp, J. (1999). On the contractile function of protein phosphatases in isolated human coronary arteries.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 360 , S. 464-472.
- Kohler, M. (2007). Metabolism of 4-hydroxyandrostenedione and 4-hydroxytestosterone: Mass spectrometric identification of urinary metabolites.
Steroids 72 , S. 278-286.
- Kolluri, R. (1996). Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 , S. 5615-5618.
- Kolodney, M. S. (1995). Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain.
Proc. Natl. Acad. Sci USA , S. 10252-10256.
- Kosik, K. a. (1987). MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebellum.
J. Neurosci. 7, 3142-3153 .
- Kousteni, S. (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity.
Cell 104 , S. 719-730.
- Lanerolle, P. d. (2005). Actin and myosin I in the nucleus: what next?
Nat. Struct. Mol. Biol. 12 , S. 742-746.
- Laurine, E. (2003). Specific Binding of Dehydroepiandrosterone to the N-Terminus of the Microtubule-associated Proteine MAP2.
The Journal of Biological Chemistry 278 , S. 29979-29986.
- Leemhuis, J. (2002). The Protein Kinase A Inhibitor H89 Acts on Cell Morphology by Inhibiting Rho Kinase.
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 300 No. 3 .
- Leeuwen, F. N. (1999). Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading.
Nature Cell Biology.
- Lei, S. (2001). Regulation of NMDA receptor activity by F-actin and myosin light chain kinase.
J. Neurosci. 21 , S. 8464–8472. Lephart, E. D. (2001).
- Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function.
Brain Research Reviews 37 , S. 25-37.

- Leung, T. (1998). Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganisation.
Mol. Cell Biol. 18 , S. 130-140.
- Liu, D. (2002). Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3).
J. Biol. Chem. 277 , S. 21379-21388.
- Liu, D. (2006). Dehydroepiandrosterone inhibits intracellular calcium release in beta-cells by a plasma membrane-dependent mechanism.
Steroids 71 , S. 691-699.
- Liu, D. (2004). Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor.
Steroids 69 , S. 279-289.
- Liu, J. (2006). Protein-Protein Interactions Mediate Mitochondrial Cholesterol Transport and Steroid Biosynthesis.
The Journal of Biological Chemistry , S. 38879-38893.
- Lønning, P. E. (2001). Pharmacokinetics and metabolism of formestane in breast cancer patients.
Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 77 , S. 39–47.
- Lopez-Carballo, G. (2002). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells.
J. Biol. Chem. 277 , S. 297-304.
- Losel, R. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 , S. 46-56.
- Luo, L. (2002). Actin Cytoskeleton Reagulation in Neuronal Morphogenesis and Struktural Plasticity.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2002. 18:601-35 .
- Luo, L. (1994). Rho GTPases in neuronal morphogenesis.
Nat. Rev. Neurosci. 1 , S. 173-180.
- Luo, L. (2000). RHO GTPases in Neuronal Morphogenesis.
Nature Reviews; Vol.1 .
- Lustig, R. (1994). Sex hormone modulation of neural development in vitro.
Horm. Behav. 28 , S. 383-395.
- Machesky, L. (1999). Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 , S. 3739-3744.
- Madaule, P. (1998). Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis.
Nature (London) 394 , S. 491-494.
- Maekawa, M. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase.
Science 285 , S. 895-898.

- Maggi, R. (1998). Effects end metabolism of steroid hormones in human neuroblastoma cells. *Steroids* 63 , S. 257-262.
- Manser, E. (1995). Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J. Biol. Chem.* 270 , S. 25070-25078.
- Masliah, E. (1995). Mechanisms of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Histol. Histopathol.* 10 , S. 509-519.
- Matsui, T. (1999). Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr. Biol.* 9 , S. 1259-1262.
- Matsui, T. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 15 , S. 2208-2216.
- McDonald, D. (2006). Nucleoplasmic beta-Aktin exists in a dynamic equilibrium between low mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J. Cell Biol.* 172 , S. 541-552.
- Melcangi, R. (1993). Testosterone and Progesterone Metabolism in the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 46 , S. 811-818.
- Mendoza-Naranjo, A. (2007). Abeta1-42 stimulates actin polymerization in hippocampal neurons through Rac1 and Cdc42 Rho GTPases. *J. of Cell Sci.* 120 , S. 279-288.
- Mertens, A. (2003). Regulation of Tiam1-Rac signaling. *FEBS Lett.* 546 , S. 11-16.
- Migliaccio, A. (2000). Steroid induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation . *EMBO J.* 19 , S. 5406-5417.
- Miki, H. (1998). Induction of filopodium formation by WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature (London)* 391 , S. 93-96.
- Milamide, L. (2000). Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat. Cell. Biol.* 2 , S. 628-636.
- Millard, T. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem. J.* 380: 1-17 .
- Miralles, F. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113 , S. 329-342.

- Miyazaki, K. (2002). Rho-dependent agonist-induced spatiotemporal change in myosin phosphorylation in smooth muscle cells.
J. Biol. Chem. 277 , S. 725-734.
- Mukai, H. (2006). Local Neurosteroid Production in the Hippocampus: Influence on Synaptic Plasticity of Memory.
Neuroendocrinology 84 , S. 255-263.
- Mulvihill, D. P. (2001). Shedding a little light on light chains.
Nature Cell Biology .
- Murakami, K. (2000). Pregnenolone binds to MAP2 and stimulates microtubule assembly.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 , S. 3579-3584.
- Murakami, N. (2000). Two Distinct Mechanisms for Regulation of Nonmuscle Myosin Assembly via the Heavy Chain: Phosphorylation for MIIIB and Mts 1 Binding for MIIA.
Biochemistry 39 , S. 11441-11451.
- Murakami, N. (1998). Two non-muscle myosin heavy chain isoforms expressed in rabbit brains: Filament forming properties, the effects of phosphorylation by protein kinase C and casein kinase II, and location of the phosphorylation sites.
Biochem. 37 , S. 1989-2003.
- Murata, K. (1997). Differential Localization of Myosin and Myosin Phosphatase Subunits in Smooth Muscle Cells and Migrating Fibroblasts.
Molecular Biology of the Cell 8 , S. 663-673.
- Nadal, A. (2001). The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects.
News Physiol. Sci. 16 , S. 251-255.
- Nemere, I. (1998). Breakthroughs and views. Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 248 , S. 443-449.
- Nobes, C. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.
Cell 81 , S. 53-62.
- Pan, J. (2005). Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase in vivo: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells.
J. of Neurochem. 93 , S. 571-583.
- Papakonstanti, E. A. (2003). A Rapid, Nongenomic, Signaling Pathway Regulates the Actin Reorganization Induced by Activation of Membrane Testosterone Receptors.
Molecular Endocrinology 17 , S. 870-881.
- Papasozomenos, S. (1997). The heat shock-induced hyperphosphorylation of tau is estrogen-independent and prevented by androgens: implications for Alzheimer disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94 , S. 6612-6617.

- Perez, J. (1996). Trophic effects of androgen receptor expression and the survival of laryngeal motor neurons after axotomy.
J. Neurosci. 16 , S. 6625-6633.
- Pestic-Dragovich, L. (2000). A myosin I isoform in the nucleus.
Science 290 , S. 337-341.
- Plassart-Schiess, E. (2001). Neurosteroids: recent findings.
Brain Research Reviews 37 , S. 133-140.
- Pollard, T. D. (2003).
Nature 422 , S. 741-745.
- Price, L. (2003). Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac.
J. Biol. Chem. 278 , S. 39413-39421.
- Przyborski, S. A.-D. (1995). Developmental regulation of MAP2 variants during neuronal differentiation in vitro.
Developmental Brain Research 89, 187-201 .
- Psarra, A.-M. G. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment.
Biochimica et Biophysica Acta 1783 , S. 1-11.
- Raber, J. (2002). Androgens protect against apolipoprotein E4-induced cognitive deficits.
J. Neurosci. 22 , S. 5204-5209.
- Rainey. (2004). Adrenarche - physiology, biochemistry and human disease.
Clinical Endocrinology 60 , S. 288-296.
- Rasika, S. (1999). BDNF mediates the effects of testosterone on the survival of new neurons in an adult brain.
Neuron 22 , S. 53-62.
- Razandi, M. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells.
Mol. Endocrinol. 13 , S. 307-319.
- Reinsch, S. M. (1991). Microtubule polymer assembly and transport during axonal elongation.
J. Cell Biol. 115, 365-379 .
- Riveline, D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism.
J. Cell Biol. 153 , S. 1175–1186.
- Rodriguez, O. C. (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis.
Nature Cell Biology 5 , S. 599-609. Saitoh, T. (2001).
- Differential localization of non-muscle myosin II isoforms and phosphorylated regulatory light chains in human MRC-5 fibroblasts.
FEBS Letters 509 , S. 365-369.

Sanchez, S. (2001). The inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3.
J. Neurochem. 78 , S. 468-481.

Sanders, L. C. (1999). Inhibition of Myosin Light Chain Kinase by p21-Activated Kinase.
Science 26 , S. 2083-2085.

Santen, R. (2003). Inhibition of aromatase: insights from recent studies.
Steroids 68 , S. 559-567.

Santen, R. J. (1999). Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma.
Endocrine-Related Cancer 6 , S. 75-92.

Satterwhite, L. (1992). Phosphorylation of myosin-II regulatory light chain by cyclin-p34cdc2: a mechanism for the timing of cytokinesis.
J. Cell Biol. 118 , S. 595-605.

Sayas, C. L. (1999). The Neurite Retraction Induced by Lysophosphatidic Acid Increases Alzheimer's Disease-like Tau Phosphorylation.
The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 52 , S. 37046-37052.

Sayas, C. (2002). Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3.
Biochimica et Biophysica Acta , S. 144-153.

Schafer, D. A. (2004). Barbed ends rule.
Nature 430 , S. 734-735.

Schägger, G. v. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa.
Ana. Biochem. 166 , S. 368-379.

Schlessinger, J. (2000). New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis.
Cell 100 , S. 293-296.

Schmidt, J. (2002). Myosin light chain phosphorylation and growth cone motility.
J. Neurobiol. 52 , S. 175-188.

Sells, M. (1999). p21-activated kinase 1 (PAK1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts.
J. Cell Biol. 145 , S. 837-849.

Shin, H. (2002). Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle.
Circ. Res. 90 , S. 546-553.

Silverman-Gavrila, R. V. (2003). Myosin Localization During Meiosis I of Crane-Fly Spermatocytes Gives Indications About Its Role in Division.
Cell Motility and the Cytoskeleton 55 , S. 97-113.

Simoncini, T. (2006). Estrogen Receptor Alpha Interacts with Galpha13 to Drive Actin Remodeling and Endothelial Cell Migration via the RhoA/Rho Kinase/Moesin Pathway.
Molecular Endocrinology .

- Simoncini, T. (2000). Interaction of oestrogen receptors with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407 , S. 538-541.
- Sirinivas-Shankar. (2006). *Nature Clinical Practice Urology* 3 , S. 653-665.
- Soderling, T. (2001). Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chem. Rev.* 101 , S. 2341–2352.
- Somylo, A. (2000). Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.* 522 , S. 177-185.
- Stull, K. a. (2001). Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J. Biol. Chem.* 276 , S. 4527–4530.
- Suzuki, H. (1978). Structure and function of chicken gizzard myosin. *J. Biochem. (Tokyo)* 84 , S. 1529-1542.
- Teichberg, W. a. (1998). Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *EMBO J.* 17 , S. 3931–3939.
- Ting, H.-J. (2004). Actin monomer enhances supervillin-modulated androgen receptor transactivation. *Biochem. and Biophys. Research Comm.* 319 , S. 393-396.
- Tolias, K. (1998). Characterization of a Rac1- and RhoGDI-associated lipid kinase signaling komplex. *Mol. Cell Biol.* 18 , S. 762-770.
- Tolias, K. (2000). Type alpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates rac-dependent actin assembly. *Curr. Biol.* 10 , S. 153-156.
- Tsuruo, Y. (1998). Influence of serum-free culture conditions on subcellular localization of steroid 5alpha-reductase in rat C6 glioma cells. *Brain Research* 801 , S. 130-136.
- Turbesky, K. (1997). A Subset of Protein Kinase C Phosphorylation Sites on the Myosin II Regulatory Light Chain Inhibits Phosphorylation by Myosin Light Chain Kinase. *Biochemistry* 36 , S. 2063-2067.
- Ueda, K. (2002). Rho-kinase contributes to diphosphorylation of myosin II regulatory light chain in nonmuscle cells. *Oncogene* 21 , S. 5852-5860.
- Wada, A. (1998). Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J.* 17 , S. 1635-1641.
- Wasserman, S. (1998). FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol.* 8 , S. 111-115.

Watanabe, N. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* 1 , S. 136-143.

Webb, S. J. (2006). The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug Metabolism Reviews* 38 , S. 89-116.

Wehling, M. (1997). Specific non-genomic effects of steroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* 59 , S. 365-393.

Westbrook, R. a. (1993). Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. *Neuron* , S. 805-814.

Widstrom, R. L. (2004). Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? *Seminars in Reproductive Medicine* 22 , S. 289-298.

Wozniak, A. (1998). Neuroblastoma and Alzheimer's disease brain cells contain aromatase activity. *Steroids* 63 , S. 263-267.

Yang, S.-H. (2004). Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *PNAS* 101 , S. 4130-4135.

Zhu, X. (2000). Activation of oncogenic pathways in degenerating neurons in Alzheimer disease. *Dev. Neurosci.* 18 , S. 433-437.

Zwain, I. H. (1999). Neurosteroidogenesis in Astrocytes, Oligodendrocytes, and Neurons of Cerebral Cortex of Rat Brain. *Endocrinology*; Vol. 140, Nr.8 , S. 3843-3852.

7.1 Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Akt	Protein-Kinase B
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AR	Androgen-Rezeptor
Arp	actin-related protein
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
Cdc42	cell division cycle 42
DC	Dünnschichtchromatographie
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure (acid)
DSS	Disuccinimidyl Suberate
ER	Estrogen-Rezeptor
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
EtOH	Ethanol
FAK	focal adhesion kinase
FCS	fetal calf serum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HBS	HEPES buffered salt solution
iAR	intrazellulärer Androgen-Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitierung
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	kilodalton
LPA	Lysophosphatidsäure (acid)
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBS	Myosin Binding Subunit
MHC	Myosin Heavy Chain
MLC	Myosin Light Chain
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
M _r	relative Molekülmasse
MR	Mental Retardation
MRCK	myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase
MRLC	Myosin Regulatory Light Chain
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
N-WASP	Neuronales Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein
P/S	Penicillin/Streptomycin
p160ROCK	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase
PAGE	Polyacrylamidgellelektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	phosphate buffered saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI-4-P5K	Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-Kinase
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-Diphosphat
PKA	Protein-Kinase A/cAMP-abhängige Protein-Kinase
PKC	Protein-Kinase C/Diacylglycerol-aktivierte Protein-Kinase

PKN	Protein-Kinase N
RA	Retinolsäure
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1
RhoA/B	Ras homologous member A/B
RNA	Ribonukleinsäure (acid)
ROK	Rho-Kinase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Src	rous sarcoma
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer neuronalen Zelle mit auswachsenden Neuriten	S.1
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines wachsenden Mikrotubulus	S.3
Abbildung 3: Modell für Mikrotubuli-Aktin-Interaktionen in einem neuronalen Wachstumskegel	S.4
Abbildung 4: Schematische Darstellung von G-Aktin und F-Aktin	S.6
Abbildung 5: Entstehung von Filopodien und Lamellipodien	S.7
Abbildung 6: Stressfasern und fokale Adhäsionskomplexe	S.7
Abbildung 7: Schematische Abbildung des Rearrangements des Aktin-Cytoskeletts eines Wachstumskegels	S.8
Abbildung 8: Schematische Darstellung von Myosin II	S.9
Abbildung 9: Rho-GTPasen als molekulare Schalter	S.12
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Signalwege von Rac und Cdc42	S.13
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Signalwegs von Rho	S.15
Abbildung 12: Rho/mDia und die Stabilisierung von Mikrotubuli in nicht-neuronalen Zellen	S.16
Abbildung 13: Schematische Darstellung der synaptischen Neurosteroidsynthese in Neuronen	S.17
Abbildung 14: Substrate, Enzyme, Produkte und Rezeptoren, die in die Reaktionen der P450 Aromatase und 5 α -Reduktase involviert sind	S.19
Abbildung 15: Ausschnitt aus den Biosynthese-Wegen von Neurosteroiden und die dazu gehörigen Enzyme	S.20
Abbildung 16: Wirkungsorte von Neurosteroiden	S.22
Abbildung 17: Schematische Darstellung des DHEA(S)-Metabolismus im Gehirn	S.23
Abbildung 18: Möglicher Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von Neurosteroiden	S.25
Abbildung 19: Hypothetisches Modell stimulatorischer Effekte von Neurosteroiden auf die Synthese und Sekretion neuroprotektiver Catecholamine	S.26
Abbildung 20: Metaboliten von Testosteron	S.28
Abbildung 21: Modell für die durch Testosteron induzierte Reorganisation des Aktinskeletts	S.30
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Phospholipid-Zusammensetzung einer lebenden und einer apoptotischen Zelle	S.59
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Kopplung von primären Aminogruppen durch DSS	S.64
Abbildung 24: Reaktionsgleichung zur Herstellung des aktivierenden F-Komplexes	S.65
Abbildung 25: Reaktionsgleichungen zur Synthese von DHEA-Bodipy	S.66
Abbildung 26: Reaktionsgleichungen zur Synthese von Testosteron-Bodipy	S.67
Abbildung 27: Reaktionsgleichungen zur Synthese von Testosteron-Bodipy, Pseudopeptidkopplung	S.68

Abbildung 28: Strukturformeln der verwendeten Inhibitoren	S.70
Abbildung 29: Schematische Darstellung der Folgemetaboliten von Testosteron und die beteiligten Enzym-Systeme/Formestan	S.71
Abbildung 30: Schematische Darstellung der Folgemetaboliten von Testosteron und die beteiligten Enzym-Systeme/Finasterid	S.79
Abbildung 31: Darstellung der Folgemetaboliten von DHEA und die beteiligten Enzym-Systeme	S.82
Abbildung 32: Schematische Darstellung der Signalwege, die die Morphologie von Neuroblastomazellen bestimmen	S.97
Abbildung 33: Rho und die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen	S.105
Abbildung 34: Reaktionsgleichung der Synthese von DHEA-Bodipy	S.118
Abbildung 35: Reaktionsgleichung der Synthese von Testosteron-Bodipy	S.118
Abbildung 36: Hauptwege der Biotransformation von Formestan im menschlichen Organismus	S.133
Abbildung 37: Die Inhibierung der 5 α -Reduktase	S.136
Abbildung 38: Die Inhibierung der Sulfotransferase	S.138
Abbildung 39: Postulierter Signalweg von Testosteron auf das Aktinskelett	S.142
Abbildung 40: Postulierter Signalweg von DHEA auf das Aktinskelett	S.146
Abbildung 41: Hypothetisches Modell der Art und Lokalisation von Rezeptoren in neuronalen Zellen, an denen es zu einer Bindung von DHEA kommen könnte	S.153

