

Mechanismen der Caveolin-Genregulation in neuronalen Zellsystemen

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Jürgen Zschocke
geboren am 30. Juni 1974 in München

Mainz, im September 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Januar 2005

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Anregung und Leitung von Prof. Dr. Christian Behl in der Zeit von April 2001 bis September 2002 am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, und von Oktober 2002 bis September 2004 am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Teile dieser Dissertation wurden bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht, welche im Anhang aufgelistet sind.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Charakterisierung der Caveolin-Genfamilie.....	1
1.1.1	Genomische Organisation und Expressionsprofil der Caveoline.....	1
1.1.2	Funktioneller Aufbau und subzelluläre Lokalisation der Caveolin-Proteine.....	2
1.2	Biogenese der Caveolae.....	4
1.3	Lipid Rafts und Caveolae - hochgeordnete Domänen in der Zellmembran.....	4
1.4	Funktionen der Caveolae und der Caveoline.....	5
1.4.1	Caveolae-vermittelte Endozytose.....	5
1.4.2	Cholesterol-Transport und -Homöostase.....	5
1.4.3	Signaltransduktion in Caveolae.....	6
1.4.4	Caveoline und das Oestrogen/Oestrogen-Rezeptor-System.....	8
1.4.4.1	Modulation der genomischen Aktivität des ER α durch Caveolin-1.....	8
1.4.4.2	Modulation der nicht-genomischen Aktivität des ER durch Caveolin-1.....	11
1.5	Funktionen der Caveolae und Caveoline im ZNS und PNS.....	12
1.5.1	Funktionen der Caveolae und Caveoline in glialen Zellen.....	12
1.5.2	Vermutete Funktionen der Caveoline in Neuronen.....	12
1.6	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Chemikalien.....	15
2.1.2	Geräte.....	17
2.1.3	Weitere Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.4	Kits.....	18
2.1.5	Enzyme - allgemein.....	18
2.1.6	Restriktions-Endonukleasen.....	19
2.1.7	Plasmide.....	19
2.1.8	Bakterienstamm.....	19
2.1.9	Primärantikörper.....	19
2.1.10	Sekundärantikörper.....	19
2.1.11	Oligonukleotide.....	20

2.1.12	Zelllinien und stabile Transfektanten.....	21
2.1.13	Tiere.....	21
2.1.14	Zusammensetzung allgemein verwendeter Puffer.....	21
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Zellkulturmethoden.....	22
2.2.1.1	Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien.....	22
2.2.1.2	Etablierung astroglialer Primärkulturen.....	22
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	22
2.2.1.4	Transfektion eukaryontischer Zellen mit Reporterplasmiden.....	23
2.2.1.5	Luciferase-Reporter-Assay.....	23
2.2.2	Immunologische Protein-Nachweisverfahren.....	24
2.2.2.1	Western-Blot-Analyse.....	24
2.2.2.1.1	Protein-Präparation und Quantifizierung.....	24
2.2.2.1.2	Detergenz-freie Präparation von Lipid Rafts/Caveolae.....	24
2.2.2.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteintransfer.....	25
2.2.2.1.4	Detektion der Membran-gebundenen Antigene.....	26
2.2.2.2	Immunzytochemie.....	26
2.2.2.3	Immunhistochemie.....	27
2.2.3	Nukleinsäure-Analytik.....	28
2.2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen.....	28
2.2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	28
2.2.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen.....	28
2.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
2.2.3.5	Polymerase-Kettenreaktion PCR.....	29
2.2.3.6	PCR-Analyse von Transformandenklonen.....	29
2.2.3.7	Real-Time-PCR-Analyse.....	30
2.2.3.8	Amplifikation von RNA (RT-PCR).....	30
2.2.3.9	Analyse der genomischen DNA-Methylierung.....	31
2.2.3.9.1	Differentielle Modifikation mit Bisulfit.....	31
2.2.3.9.2	Restriktionsanalyse.....	31
2.2.3.10	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	32
2.2.3.11	Southern-Blot-Analyse.....	32
2.2.3.11.1	Nukleinsäure-Transfer.....	32
2.2.3.11.2	Sondenherstellung.....	33
2.2.3.11.3	Hybridisierung mit der radioaktiv-markierten Sonde.....	34
2.2.3.12	Klonierung von PCR-Amplifikaten mittels pGEM Teasy Vector.....	34
2.2.4	Mikrobiologische Methoden.....	34

2.2.4.1	Herstellung chemisch kompetenter E.coli-Zellen.....	34
2.2.4.2	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock.....	35
2.2.4.3	Kultivierung von Bakterien.....	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Modulation der Caveolin-Expression durch das Oestrogen-System.....	36
3.1.1	Der ER-Status von SK-N-MC-Zellen und stabilen ER-Transfektanten....	36
3.1.2	Suppression der Caveolin-1/-2-Expression durch ER α	39
3.1.3	Differentielle Methylierung des Caveolin-1 Promoters in SK-Zellklonen.....	43
3.1.3.1	DNA-Bisulfit-Sequenzierung.....	43
3.1.3.2	Diagnostischer <i>Taq</i> I-Restriktionsverdau.....	47
3.1.3.3	Pharmakologische Inhibition der DNMT und HDAC.....	49
3.1.3.4	Vergleich der Expressionsstärken der DNMTs in SK-Zellklonen.....	51
3.1.3.5	Southern-Blot Analyse mit LINE-1 Sonden.....	53
3.1.4	Reaktivierung von Caveolin-1 durch MAP-Kinase-Inhibitoren.....	55
3.1.5	Pränatale Oestrogen-Behandlung schwangerer Mäuse.....	57
3.2	Regulation der Caveolin-Genexpression durch cAMP und TGF α in Astrozyten.....	59
3.2.1	Repression der Caveolin-Expression durch cAMP in kortikalen Astrozyten.....	60
3.2.2	Repression der Caveolin-Expression durch TGF α in kortikalen Astrozyten.....	62
3.2.3	Effekte von cAMP und TGF α auf die Caveolin-Transkription.....	63
3.2.4	Signaltransduktionswege bei der TGF α -vermittelten Caveolin-Suppression.....	66
3.2.5	Einfluß der Histon-Modifikation auf die Caveolin-1-Suppression.....	67
3.2.6	Hirnregion-spezifische Unterschiede in der Regulation der Caveolin-Expression.....	69
3.3	Bestimmung der GLT-1 Lokalisation in Lipid Rafts.....	70
4	Diskussion.....	75
4.1	ER α -vermittelte Suppression der Caveolin-Expression in SK-N-MC-Zellen.....	75
4.1.1	Ligand-unabhängige Suppression der Caveolin-Expression durch ER α	76

4.1.2	Epigenetische Faktoren der Caveolin-Suppression in SK-ER α -Zellen.....	78
4.1.3	Chronische pränatale Oestrogen-Behandlung.....	80
4.1.4	Caveolin als Mediator klassischer Oestrogen-Effekte?.....	82
4.1.4.1	Tumorbiologische Aspekte der ER α -vermittelten Caveolin-Suppression.....	82
4.1.4.2	Neurobiologische Aspekte der ER α -vermittelten Caveolin-Suppression.....	84
4.2	Effekt von TGF α auf die Caveolin-Expression in Astrozyten.....	86
4.3	Effekt von cAMP auf die Caveolin-Expression in Astrozyten.....	89
4.4	Ausblick.....	90
5	Zusammenfassung/Summary.....	92
6	Referenzen.....	96
7	Anhang.....	120

1 Einleitung

In der Mitte der 50er Jahre wurden erstmals elektronenmikroskopisch sichtbare Invaginationen in der eukaryontischen Zellmembran beschrieben, die bezüglich ihrer Form an kleine Höhlen („little caves“) erinnerten (Yamada 1955, Abb. 1A). In Anlehnung an ihre Struktur wurden diese Membrandomänen Caveolae genannt. Seit Entdeckung der Caveolae verdichteten sich die Hinweise, daß spezielle Lipide und membranassoziierte Proteine nicht gleichmäßig in der Lipid-Doppelschicht verteilt sind, sondern konzentriert in Caveolae und Caveolae-verwandten Membrandomänen vorliegen. Beispielsweise sind Caveolae reich an Cholesterol sowie Sphingolipiden und bilden eine strukturelle Plattform für zahlreiche Signalmoleküle. Die geordnete Zusammenlagerung von Membranproteinen wie Rezeptoren und Adaptermolekülen in distinkten Membrandomänen erlaubt die räumliche und zeitliche Koordination unterschiedlicher Signaltransduktionswege. Die Idee der Integration von Signalkaskaden bereits auf Membranebene wird weithin als „Caveolae-Signal-Hypothese“ beschrieben. Aufgrund des großen Einflusses von Caveolae auf eine Vielzahl zellbiologischer Prozesse gewinnen neue Kenntnisse über diese Membrandomänen und deren Komponenten, allen voran Caveolin, an zunehmender Bedeutung.

1.1 Charakterisierung der Caveolin-Genfamilie

1.1.1 Genomische Organisation und Expressionsprofil der Caveoline

Caveoline sind die strukturellen und funktionellen Hauptbestandteile der Caveolae. Sie sind maßgeblich an deren Biogenese beteiligt und regulieren die Lokalisation sowie Aktivität zahlreicher Caveolae-assoziiierter Proteine. Das Protein VIP21 wurde im Jahre 1992 als erstes Mitglied der Caveolin-Genfamilie aus Transportvesikeln des Trans-Golgi-Netzwerks eukaryontischer Zellen isoliert (Kurzchalia et al. 1992). Nachdem VIP21 als strukturegebender Bestandteil von Caveolae identifiziert wurde, erfolgte eine Umbenennung des Proteins zu Caveolin-1 (Glenney 1992; Glenney und Soppet 1992). Bis heute wurden zwei weitere Caveolin-Subtypen kloniert, die in Folge als Caveolin-2 und Caveolin-3 bezeichnet wurden (Scherer et al. 1996; Tang et al. 1996).

Im Hinblick auf die genomische Organisation sowie das Expressionsprofil zeigen die Subtypen 1 und 2 grundlegende Gemeinsamkeiten. Die humanen Gene für Caveolin-1 und Caveolin-2 sind auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q31.1) lokalisiert und bestehen jeweils aus drei Exons (Engelman et al. 1999a). Die Entfernung beider Gene zueinander beträgt lediglich 19 kb. Die Promoterbereiche sowie die ersten Exons weisen einen hohen CpG-Dinukleotidgehalt auf und erfüllen die Kriterien einer nach Frommer definierten CpG-Insel (Gardiner-Garden und Frommer 1987). Generell werden Caveolin-1 und Caveolin-2 ubiquitär co-exprimiert (Scherer et al. 1997). Besonders hohe Konzentrationen findet man

jedoch in Adipozyten, Pneumozyten und Endothelzellen (Scherer et al. 1996). Caveolin-1 und -2 werden auch in Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) detektiert (Cameron et al. 1997; Ikezu et al. 1998b), wobei detaillierte Studien über hirnregionspezifische und entwicklungsstadienabhängige Caveolin-Expressionsmuster bislang fehlen. Sowohl neuronale als auch gliale Zellen exprimieren Caveolin-1/-2 in Abhängigkeit ihres Gewebekontexts. So weisen murine Astrozyten *in vivo* kaum detektierbare Caveolin-1/-2-Spiegel auf, reaktivieren aber die Caveolin-1/-2-Expression *in vitro* unter Primärkulturbedingungen (Cameron et al. 1997; Ikezu et al. 1998b). Auch die Detektion der neuronalen Caveolin-1/-2-Expression *in vivo* erweist sich als schwierig, im Gegensatz zu den signifikant nachweisbaren Caveolin-Spiegeln in Primärkulturen von murinen hippocampalen Neuronen (Braun und Madison 2000; Bu et al. 2003) oder in neuronalen Zelllinien (Galbiati et al. 1998b). Im Einklang mit den Befunden für Endothelzellen zeigen Zellen der Bluthirnschranke eine starke Caveolin-1/-2-Expression (Ikezu et al. 1998b).

Caveolin-3 nimmt bezüglich der genomischen Organisation und des Expressionsprofils eine Sonderstellung innerhalb der Caveolin-Genfamilie ein. Die humane Caveolin-3-Sequenz befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 (3p25) und besteht aus nur 2 Exons (Minetti et al. 1998). Die Caveolin-3-Expression ist mit wenigen Ausnahmen auf Muskelzellen beschränkt, vor allem auf Zellen der Skelett- und Herzmuskulatur (Tang et al. 1996). Interessanterweise findet man aber eine starke Caveolin-3-Expression in Astrozyten des ZNS, die unter Primärkulturbedingungen *in vitro* nahezu vollständig unterdrückt wird (Ikezu et al. 1998b).

Zum humanen Caveolin homologe DNA-Sequenzen liegen im Genom verschiedener Spezies wie Kuh, Ratte, Maus, *Xenopus* und *Caenorhabditis elegans* (Tang et al. 1997) vor, und sind relativ stark konserviert. Die murine Caveolin-Genfamilie, die ebenfalls aus drei Mitgliedern besteht, ist auf dem Chromosom 6-A2 (Caveolin-1/-2) und 6-E1 (Caveolin-3) lokalisiert (Engelman et al. 1998b). Das Vorhandensein Caveolin-homologer Sequenzen in niederen Säugetieren oder Invertebraten ermöglicht Untersuchungen zur Funktion und Regulation der Caveolin-Genfamilie in verschiedenen Tiermodellen.

1.1.2 Funktioneller Aufbau und subzelluläre Lokalisation der Caveolin-Proteine

Die Caveolin-Gene kodieren für 18-25 kDa große Proteine, die eine ungewöhnliche perimembranäre Topologie aufweisen. Die funktionellen Domänen der Caveoline werden hauptsächlich vom letzten Exon kodiert und besitzen für alle Caveolin-Subtypen einen vergleichbaren Aufbau. Stellvertretend wird im folgenden Abschnitt der funktionelle Aufbau von Caveolin-1 beschrieben (Abb. 1B). Eine zentrale hydrophobe Domäne (AA 102-134) verankert Caveolin-1 über eine mutmaßliche Haarnadel-ähnliche Struktur in der Zellmembran (Williams und Lisanti 2004). In der Folge ragen sowohl N- als auch C-Terminus in das

Zytoplasma. Im N-terminalen Abschnitt des Proteins vermittelt eine Homo-Oligomerisationsdomäne (OD; AA 61-101) die gegenseitige Interaktion mehrerer Caveolin-Moleküle, welche in der Zellmembran hochmolekulare homo- und hetero-oligomere Komplexe ausbilden (Sargiacomo et al. 1995). Ein Bestandteil dieser Domäne ist auch die Caveolin-Scaffolding-Domäne (CSD, AA 82-101) (Li et al. 1996). Es sind eine Reihe von Caveolae-assoziierten Proteinen bekannt, darunter viele Signalproteine, die über die CSD direkt mit den Caveolinen interagieren. Der C-Terminus von Caveolin-1 trägt mehrere Palmitoylanker (Dietzen et al. 1995), die für die Translokation von zytoplasmatischem Caveolin-1 an die Zellmembran benötigt werden und die Bindung von Caveolin-1 an Cholesterol vermitteln (Uittenbogaard und Smart 2000).

In der Zelle sind Caveolin-Moleküle auf verschiedene, räumlich getrennte Subkompartimente verteilt. Die Caveoline sind im endoplasmatischen Retikulum (Smart et al. 1994), im Golgi-Netzwerk (Kurzchalia et al. 1992) und in Plasmamembran-Caveolae lokalisiert. Abhängig vom Zelltyp sind über 90% der Gesamtpopulation von Caveolin-Molekülen in Caveolae zu finden (Rothberg et al. 1992). Ein geringer Anteil liegt auch im Zytoplasma der Zelle gebunden an Hitzeschock-Proteine vor (Uittenbogaard et al. 1998). Am rauhen endoplasmatischen Retikulum erfolgt die co-translationale Synthese der Caveoline, welche bereits dort Homo-Oligomere aus 14-16 Molekülen ausbilden (Monier et al. 1995). Erreichen die Caveolin-Komplexe das Golgi-Kompartiment, findet ein zweiter Schritt der Oligomerisierung statt, der zuletzt in den Caveolae abgeschlossen wird. Dort interagieren dann mehrere Caveolin-Oligomere miteinander, um wie ein mantelartiges Netzwerk die Invagination der Zellmembran zu induzieren (Sargiacomo et al. 1995).

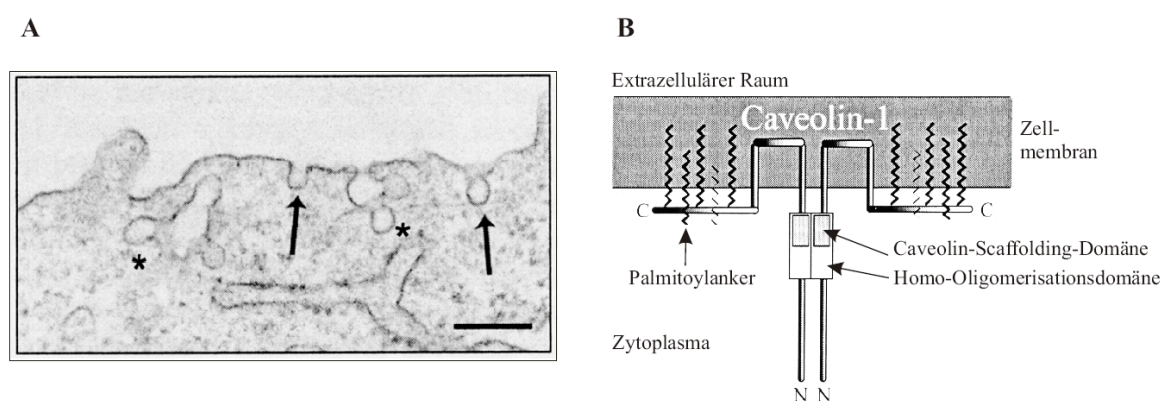


Abb. 1. Caveoline sind die strukturgebenden Bestandteile von Plasmamembran-Caveolae. A. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Caveolae, die omega-förmige Einstülpungen der Zellmembran mit einem Durchmesser von 50-100 nm darstellen (Pfeile). Bei endozytotischen Prozessen erfolgt die Abschnürung der Caveolae, die folglich als Vesikel im Zytoplasma vorliegen (Sternchen). Der Skalenbalken entspricht 200 nm. (van Deurs et al. 2003) B. Die schematische Skizze zeigt den funktionellen Aufbau des Caveolin-1-Proteins, welches über eine hydrophobe Domäne in der Zellmembran verankert ist. Die Homo-Oligomerisationsdomäne vermittelt die Interaktion von zwei und mehr Caveolin-Molekülen. Die Caveolin-Scaffolding-Domäne dient der Interaktion mit zahlreichen Caveolae-assoziierten Signalmolekülen (modifiziert nach Razani et al. 2000).

1.2 Biogenese der Caveolae

Der exakte molekulare Mechanismus, welcher die Caveolin-vermittelte Invagination der Zellmembran bewirkt, ist bisher nicht bekannt. Erste Studien auf diesem Gebiet belegen, daß Caveolin-negative Zellen im Allgemeinen keine Caveolae-artigen Strukturen ausbilden. Wird Caveolin-1 in diesen Zellen ektopisch exprimiert, induziert man die *de novo* Bildung von Caveolae (Fra et al. 1995b). Überraschenderweise zeigt die Überexpression von Caveolin-2 keine vergleichbaren Effekte. In Abwesenheit von Caveolin-1 wird Caveolin-2 im Golgi-Apparat zurückgehalten und erreicht nicht die Zellmembran (Parolini et al. 1999). Bereits im endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi-Netzwerk interagieren beide Caveolin-Subtypen, um hetero-oligomere Proteinkomplexe auszubilden (Monier et al. 1995). Der Golgi-Apparat wird hierbei als derjenige Ort diskutiert, an dem die Caveolae-Bildung eingeleitet wird. Aufgrund der Eigenschaft von Caveolin-1, mit zwei Hauptbestandteilen der Caveolae, Cholesterol und Sphingolipiden, zu interagieren (Fra et al. 1995a; Murata et al. 1995), lagern sich Caveolin-Oligomere im Golgi-Apparat bevorzugt in Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Domänen ein, die schließlich zur Zellmembran migrieren. Resultat dieser Prozesse ist die Entstehung von meist omega-förmigen Membraninvaginationen, die einen Durchmesser von ca. 50-100 nm aufweisen (Abb. 1A). Senkt man den Cholesterol-Spiegel der Zelle, kommt es zu einer Rückverteilung Caveolins von der Plasmamembran in intrazelluläre Membrankompartimente (Rothberg et al. 1992). Damit einhergehend reduziert sich die Anzahl der Plasmamembran-Caveolae signifikant. Diese Befunde unterstreichen die wichtige Rolle des Cholesterols für die Biogenese der Caveolae.

1.3 Lipid Rafts und Caveolae - hochgeordnete Domänen in der Zellmembran

Wie die Biogenese der Caveolae verdeutlicht, zeichnen sich diese Membrandomänen nicht nur durch ihre besondere Form als vesikuläre Invaginationen aus, sondern auch durch ihre charakteristische Lipid-Zusammensetzung. Caveolae enthalten bis zu 30% des Plasmamembran Cholesterols und bis zu 95% des zellulären Sphingomyelins, welche diesen Membrandomänen charakteristische biochemische und physikalische Eigenschaften verleihen (Brown und Rose 1992). So sind Caveolae beispielsweise gegenüber milden (nicht-ionischen) Detergenz-Solubilisierungen resistent (Brown und London 1997). In der Zellbiologie werden solche Membrandomänen auch als „Lipid Rafts“ bezeichnet (Kenworthy 2002). Lipid Raft ist hierbei ein Überbegriff, der alle Membrandomänen mit den erwähnten Eigenschaften der Solubilisierungsresistenz umschreibt. Caveolae sind eine Unterform von Lipid Rafts, die durch das Vorhandensein von Caveolin-Proteinen gekennzeichnet sind, und elektronenmikroskopisch leicht an ihrer Form zu identifizieren sind. Dagegen bilden Lipid Rafts, die keine Caveolin-Komplexe tragen, generell keine Membraneinstülpungen aus. Aus diesem Grund ist die Identifizierung von Lipid Rafts problematischer und mit konventionellen

bildgebenden Techniken nicht zu bewerkstelligen. Moderne Verfahren wie die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Mikroskopie können jedoch dabei helfen, die native Struktur von Lipid Rafts in Zellmembranen zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wird bei Verwendung des Begriffs „Raft“ die Abwesenheit von Caveolin impliziert, um eine Unterscheidung zum Begriff „Caveolae“ herzustellen.

1.4 Funktionen der Caveolae und der Caveoline

1.4.1 Caveolae-vermittelte Endozytose

Aufgrund ihrer vesikulären Morphologie konzentrierten sich die ersten Untersuchungen zur Funktionalität der Caveolae hauptsächlich auf endo- und transzytotische Prozesse. In der Tat existieren Mechanismen zur Internalisierung bestimmter Proteine durch Caveolae, die sich von denen der Clathrin-abhängigen Invaginationen unterscheiden. Der Folsäure-Rezeptor, Albumin, alkalische Phosphatase und das Cholera-Toxin gehören zu denjenigen Molekülen, die selektiv über Caveolae endozytiert werden (Pelkmans und Helenius 2002). Hierbei sind die molekularbiologischen Abläufe in Abhängigkeit von den Eigenschaften des internalisierten Moleküls verschieden. In einigen Fällen wird die Internalisierung durch die Aktivierung von Phosphorylierungskaskaden getrieben. Dies setzt die Aktivierung von Caveolae-assoziierten Signalmolekülen, wie z.B. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, durch extrazelluläre Liganden voraus. So können Phosphatase-Inhibitoren wie Okadeinsäure die Internalisierung von Caveolae induzieren (Parton et al. 1994). Für die Abschnürung der Caveolin-Vesikel in das Zytoplasma wurde eine Beteiligung der GTPase Dynamin nachgewiesen (Henley et al. 1998; Oh et al. 1998). Dynamin ist Mitglied der Dynamin-Superfamilie von GTPasen und ist generell an der Knospung von Transportvesikeln und der Trennung von Zellorganellen beteiligt (Praefcke und McMahon 2004). Haben sich die Caveolin-Vesikel von der Zellmembran abgeschnürt, folgen sie bedingt durch eine Umorganisation des Zytoskeletts intrazellulären Routen, die letztlich in sogenannten Caveosomen münden (Nichols 2003). Bezüglich ihrer Zusammensetzung und ihres pH-Wertes unterscheiden sich Caveosomen von Endosomen, fungieren aber auch als Sortierungsorganell der Zelle. Von den Caveosomen aus werden die internalisierten Moleküle zum endoplasmatischen Retikulum, zum Golgi-Komplex und möglicherweise zu anderen Zellkompartimenten verteilt.

1.4.2 Cholesterol-Transport und -Homöostase

Es wurde bereits auf die wichtige Interaktion von Caveolin und Cholesterol für die Biogenese von Caveolae hingewiesen. Des Weiteren spielen Caveolae/Caveoline für den Cholesterol-Transport und die Cholesterol-Homöostase eine entscheidende Rolle. Sowohl *de novo* synthetisiertes Cholesterol als auch aus LDL-Partikeln stammendes Cholesterol, welches

zuvor über Clathrin-Coated Pits internalisiert wurde, sammelt sich in der Zellmembran spezifisch in Caveolae-Membrandomänen an. Caveolin-1 unterstützt hierbei den Transport des Cholesterols zur Zellmembran (Uittenbogaard und Smart 2000). Dort angelangt vermitteln Caveolae den Efflux freien Cholesterols an extrazelluläre Transportsysteme, wie z.B. HDL-Partikel (Fielding et al. 1999). Die Senkung des Caveolin-Spiegels führt daher in bestimmten Zelltypen zu einem verminderten Efflux von Cholesterol. Interessanterweise ist der HDL-Rezeptor SR-BI (Typ 1) mit Caveolae assoziiert, eine Beobachtung, welche die physiologische Signifikanz der Caveolae für die Cholesterol-Homöostase untermauert (Babitt et al. 1997).

1.4.3 Signaltransduktion in Caveolae

Nach der elektronenmikroskopischen Identifizierung der Caveolae wurden Verfahren entwickelt, mit deren Hilfe Caveolae aufgereinigt und ihre biochemische Zusammensetzung charakterisiert werden konnte (Lisanti et al. 1999). Diese Methoden nutzen entweder die Unlöslichkeit von Caveolae in milden Detergenzien aus, oder deren physikalische Eigenschaft, in Saccharose-Dichtegradienten als relativ leichte Fraktion eine bestimmte Position innerhalb des Gradienten einzunehmen. Die Untersuchungen ergaben, daß neben Caveolin, Cholesterol und Sphingolipiden zahlreiche Signaltransduktionsproteine in Caveolae angereichert sind. Im Vergleich zum Großteil der verbleibenden Plasmamembran ist die Konzentration dieser Proteine in Caveolae um ein Vielfaches erhöht. Mittlerweile umfaßt die Liste der Caveolae-assoziierten Proteine ca. 30 Moleküle, von denen viele direkt mit Caveolin-1 interagieren (Smart et al. 1999). Zu diesen Caveolin-Interaktionspartnern gehören Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (EGF-, PDGF-Rezeptoren, TrkA, cNeu), G-Protein gekoppelte Rezeptoren sowie eine Reihe weiterer Enzyme, wie Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MEK1/2, ERK1/2), NO-Synthasen (endotheliale und neuronale) und sekundäre Botenstoff-aktivierte Proteinkinasen (Proteinkinase A und C). Gemeinsames Merkmal der Aminosäuresequenz dieser Moleküle ist ein Konsensus-Caveolin-Bindungsmotiv, welches eine Interaktion mit der CSD der Caveoline vermittelt (Couet et al. 1997a). Bis auf wenige Ausnahmen inhibiert Caveolin-1 die Aktivität seiner Interaktionspartner. Es handelt sich hierbei um dynamische Interaktionsprozesse, die streng reguliert werden. Diese dienen entweder der Aufrechterhaltung des inaktiven Zustands von Signalproteinen in Abwesenheit eines Stimulus, oder der Begrenzung der Signalübertragung nach erfolgter Stimulation. Besonders gut sind die inhibitorischen Effekte von Caveolin-1 auf die EGF-Rezeptor-MEK1/2-ERK1/2 Signalkaskade charakterisiert. Beim EGF-Rezeptor handelt es sich um eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die nach Bindung des Liganden EGF aktiviert wird. Die resultierende Dimerisierung des Rezeptors löst die Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste seiner zytoplasmatischen Domäne aus. Die entstehenden Phosphotyrosinreste

dienen als Bindungsstellen für Adaptermoleküle, die wiederum die Kinasen MEK1/2 rekrutieren und aktivieren. MEK1/2 katalysiert die Phosphorylierung von ERK1/2, welches daraufhin selbst als Kinase aktiviert wird. ERK1/2 phosphoryliert schließlich eine Vielzahl von Zielproteinen, darunter auch Transkriptionsfaktoren, und verändert deren Aktivität. Caveolin-1 interagiert mit drei Komponenten dieses Signalweges, dem EGF-Rezeptor (Couet et al. 1997b), MEK1/2 und ERK1/2 (Engelman et al. 1998a). Die physiologische Relevanz dieser Interaktionen wurde bislang hauptsächlich in Fibroblasten untersucht. So wurde gezeigt, daß in seneszenten Zellen, die eine starke Caveolin-Expression aufweisen, keine Phosphorylierung von ERK1/2 nach EGF-Behandlung mehr erfolgt (Park et al. 2000). Im Gegensatz dazu wird in jungen Fibroblasten mit geringen Caveolin-Spiegeln eine ausgeprägte EGF-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet. Wird in diesen Zellen Caveolin-1 überexprimiert, kommt es zu einer drastischen Reduktion des relativen Anteils an phosphoryliertem ERK1/2-Protein. Zudem konnte gezeigt werden, daß die zielgerichtete Reduktion der Caveolin-1-Expression in NIH3T3-Zellen zu einer konstitutiven Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade führt (Galbiati et al. 1998a).

Ein weiteres Beispiel für die vielfältigen Angriffsziele von Caveolin innerhalb bestimmter Signalkaskaden stellt der cAMP-abhängige Signaltransduktionsweg dar. Das Signal zur Generierung von cAMP erfolgt zumeist über die Aktivierung von Sieben-Helix-Transmembran-Rezeptoren. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor führt hierbei zu einer Aktivierung von Rezeptor-assoziierten heterotrimeren G-Proteinen, welche daraufhin in eine $\beta\gamma$ -Untereinheit und eine α -Untereinheit dissoziieren, wobei letztere GTP trägt und eine intrinsische GTPase-Aktivität besitzt. Die GTP-tragende α -Untereinheit bindet und aktiviert eine membranständige Adenylat-Cyclase (AC), welche ATP in freies, zyklisches AMP (cAMP) umwandelt. cAMP wiederum aktiviert die multifunktionelle Proteinkinase A (PKA), indem es an deren regulatorische Untereinheiten bindet und so die katalytischen Untereinheiten freisetzt. Die aktivierte PKA phosphoryliert schließlich spezifische Serin- und Threoninreste in Zielproteinen und moduliert dadurch deren Aktivität. Ein klassisches Zielprotein von PKA ist der Transkriptionsfaktor CREB (cAMP-response element binding protein). Caveolin-1 interagiert direkt mit der GTPase-Domäne der G-Protein-Untereinheit (Li et al. 1995), der Adenylat-Cyclase (Toya et al. 1998) und der katalytischen Untereinheit der PKA (Razani und Lisanti 2001) und inhibiert in allen Fällen die katalytische Aktivität der beteiligten Enzyme. Die funktionelle Auswirkung der inhibitorischen Effekte von Caveolin-1 wurde unter anderem in der Nierenkarzinom-Zelllinie 293T untersucht. In diesem Zellsystem wird die PKA-vermittelte Phosphorylierung des CREB-Transkriptionsfaktors durch die transiente Co-Expression von Caveolin-1 vollständig aufgehoben (Razani und Lisanti 2001).

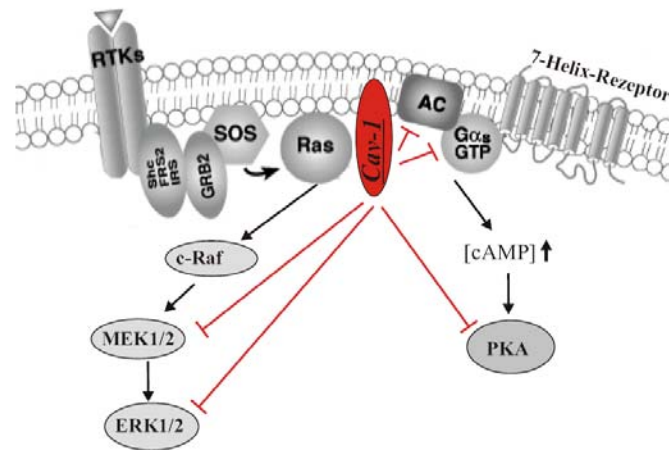


Abb. 2. Caveolin-1 interagiert mit verschiedenen Komponenten der Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)-abhängigen sowie der 7-Helix-Rezeptor-abhängigen Signaltransduktionswege. Hierbei zeigt Caveolin-1 eine inhibitorische Wirkung auf Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), MEK1/2, ERK1/2, Adenylat-Cyclase (AC), heterotrimeren G-Proteine und Proteinkinase A (PKA).

Die organisierte Zusammenlagerung einzelner Komponenten bestimmter Signaltransduktionswege in Caveolae ermöglicht somit nicht nur den regulierten Ablauf von Signalkaskaden, sondern auch solche pleiotropen inhibitorischen Effekte wie die des Caveolins (Abb. 2).

1.4.4 Caveoline und das Oestrogen/Oestrogen-Rezeptor System

Vor ca. fünf Jahren konnte gezeigt werden, daß Caveolin nicht nur die Aktivität Membran-gekoppelter Signaltransduktionsprozesse reguliert, sondern auch das Oestrogen/Oestrogen-Rezeptor System beeinflusst (Schlegel et al. 1999). Hierbei interagiert Caveolin-1 direkt mit dem Oestrogen-Rezeptor α ($ER\alpha$) und steuert seine transkriptionelle Aktivität sowie subzelluläre Lokalisation.

1.4.4.1 Modulation der genomischen Aktivität des $ER\alpha$ durch Caveolin-1

Oestrogen-Rezeptoren (ER) gehören zur Familie der Steroid-Rezeptoren und werden einerseits in klassischen Oestrogen-Zielgeweben wie den weiblichen Sexualorganen (Dryden und Anderson 1977) und dem Knochengewebe (Manolagas und Kousteni 2001) exprimiert. Andererseits erfüllen sie auch in einer Vielzahl weiterer Gewebe spezifische Funktionen. So sind ERs in neuronalen und glialen Zellen des ZNS exprimiert, wo sie neurobiologische Prozesse der Lokomotion, Kognition und des Gedächtnisses beeinflussen (Behl 2002a; Behl 2002b). Viele der ER-induzierten Effekte sind auf ihre Funktion als Transkriptionsfaktor zurückzuführen, weshalb in diesem Zusammenhang auch von den genomischen Effekten des ER gesprochen wird. Bis heute sind zwei ER-Subtypen identifiziert, $ER\alpha$ (Green et al. 1986)

und ER β (Kuiper et al. 1996). Beide Subtypen zeigen eine ähnliche funktionelle Organisation, die durch eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (AF-1), gefolgt von einer zinkfingerenthaltenden DNA-Bindungsdomäne und einer C-terminalen Ligandbindungsdomäne gekennzeichnet ist (Pike et al. 2000; Abb. 3A). Die Ligandbindungsdomäne beinhaltet auch die Transaktivierungsdomäne AF-2. In Abwesenheit des Liganden Oestrogen liegt der ER mit Hitzeschock-Proteinen komplexiert in einer Gleichgewichtsverteilung zwischen Zytoplasma und Zellkern vor. Bindet der Ligand an den Rezeptor, unterläuft dieser eine Konformationsänderung. Die Hitzeschock-Proteine werden freigesetzt, und der Rezeptor diffundiert in den Zellkern und bindet als Homo- oder Heterodimer an Oestrogen-Response-Elemente (ERE) der DNA. ERE-Sequenzen sind in Promotoren von ER-Zielgenen lokalisiert und setzen sich aus palindromischen oder halbpalindromischen DNA-Sequenzen zusammen (Donaghue et al. 1999; Klein-Hitpass et al. 1988). Am Zielgen-Promoter gebunden, stabilisieren die Transaktivierungsdomänen AF-1 und AF-2 des ER den basalen Transkriptionsapparat. Zudem erfolgt eine Öffnung der Chromatinstruktur, welches die Anlagerung weiterer Transkriptionsfaktoren an den Promoter erlaubt. In der Folge wird die Expression des entsprechenden Gens verstärkt beziehungsweise induziert. Außerdem können ERs die Transkription bestimmter Zielgene durch bisher weitgehend unbekannte Mechanismen unterdrücken (Moggs und Orphanides 2001).

Die transkriptionelle Aktivität des Oestrogen-Rezeptors wird nicht nur durch den endogenen Liganden Oestrogen reguliert, sondern auch durch co-regulatorische Faktoren (Moggs und Orphanides 2001). Co-Aktivatoren des ER, wie die Proteine SRC1-3 und CBP/p300 (Hanstein et al. 1996), interagieren mit dem ligand-tragenden Rezeptor und verstärken seine transkriptionelle Aktivität (McKenna et al. 1999). Viele der Co-Aktivatoren besitzen eine intrinsische Histon-Acetyltransferase-(HAT)-Domäne (Spencer et al. 1997). Die durch HAT katalysierte Acetylierung des N-Terminus der Histone H3 und H4 führt zu einer verminderten Assoziation dieser Histone mit der DNA. Die daraus resultierende sterische Öffnung der nukleosomalen Struktur erleichtert die Ausbildung eines stabilen Transkriptions-initiationskomplexes am Genpromoter (Abb. 3B).

Dagegen inhibieren Co-Repressoren wie NCoR oder SMRT (Jackson et al. 1997; Lavinsky et al. 1998) die ER-vermittelte Transkription in Abhängigkeit synthetischer Oestrogen-Antagonisten oder endogener Modulatoren. So rekrutiert SMRT Histon-Deacetylasen (Nagy et al. 1997), die eine Kompaktierung der Chromatinstruktur induzieren (Abb. 3B).

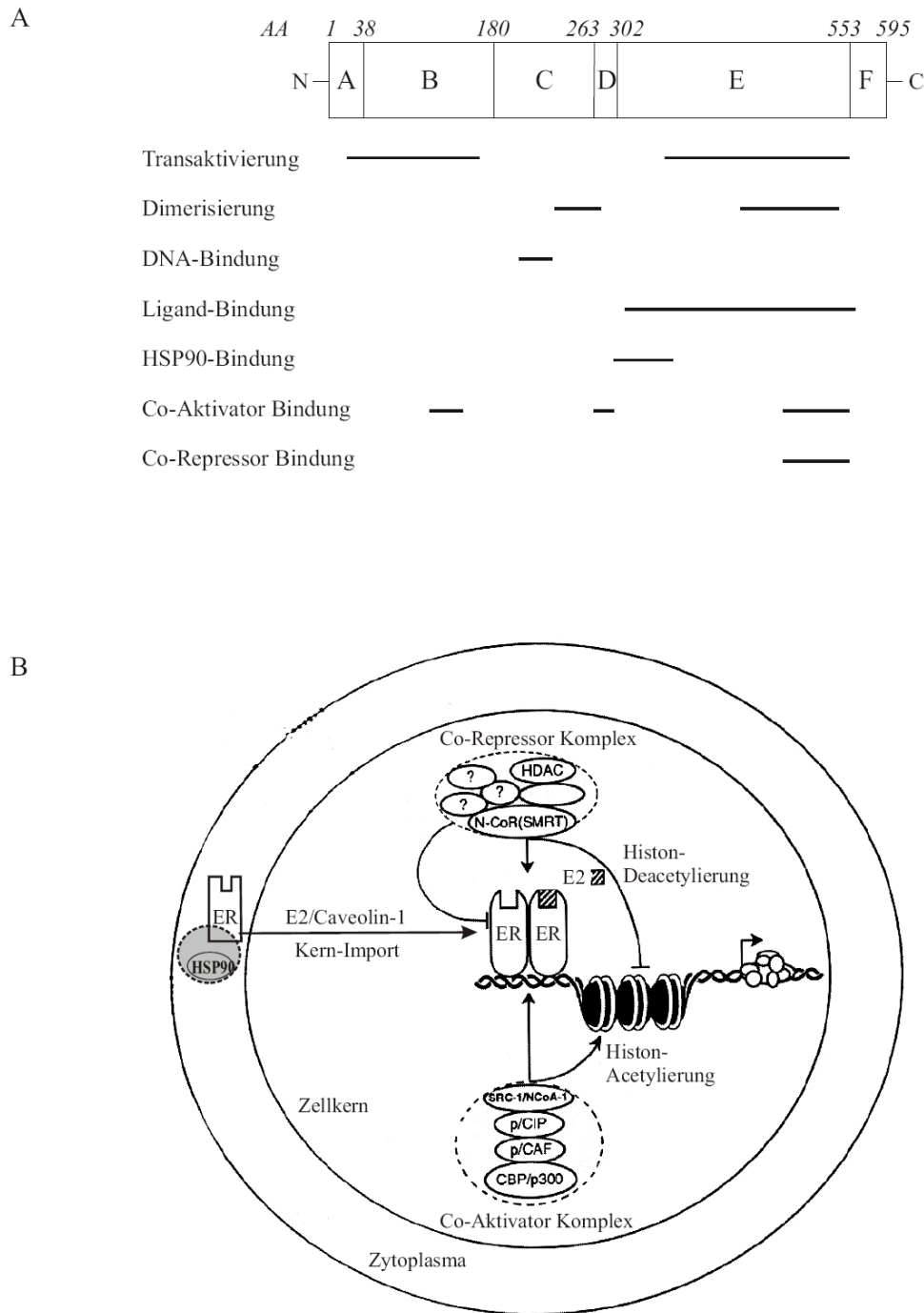


Abb. 3. Aufbau und genomische Aktivität des Oestrogen-Rezeptors. **A.** Die Primärstruktur zeigt den modularen Aufbau des ER α mit den sechs Domänen A-F. Die schwarzen Linien repräsentieren die funktionellen Domänen mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne AF-1, der DNA-Bindungsdomäne und Hormon-Bindungsdomäne, welche auch die Dimerisierung des Rezeptors vermittelt. **B.** Oestrogen (E2) fördert den Kernimport sowie die Dimerisierung des Rezeptors, der an Oestrogen-Response-Elemente der DNA bindet. Im Zusammenspiel mit Co-Aktivatoren wie CBP/p300 wird der Transkriptionsapparat stabilisiert und die Chromatinstruktur mittels Histon-Acetylierung geöffnet. In Abwesenheit des Liganden kann der Rezeptor im Komplex mit Co-Repressoren vorliegen, welche Histon-Deacetylasen (HDAC) rekrutieren und durch Kompaktierung des Chromatins Transkriptionsprozesse inhibieren (modifiziert nach Barrett und Spelsberg 1998).

Von Schlegel und Mitarbeitern wurden im Jahr 1999 sowohl eine funktionelle als auch physikalische Interaktion von Caveolin-1 mit dem ER α beschrieben (Schlegel et al. 1999). Caveolin-1 verstärkt die genomische Aktivität des ER α , indem es zum einen die Translokation des Rezeptors in den Zellkern forciert, und zum anderen die Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste in der AF-1-Domäne des Rezeptors induziert (Schlegel et al. 2001). Aufgrund der erhöhten basalen Phosphorylierung assoziieren weitere Co-Aktivatoren mit der AF-1 Domäne des ER α und verstärken in der Folge dessen genomische Aktivität. Im Gegensatz zur großen Mehrheit der ER-assoziierten Co-Aktivatoren, welche ausschließlich mit ligand-gebundenen Rezeptoren interagieren, induziert Caveolin-1 auch die ligand-unabhängige Aktivierung des ER α . Über die funktionelle Interaktion hinaus konnte auch eine physikalische Interaktion beider Moleküle nachgewiesen werden. Caveolin-1 bindet über seine CSD an die AF-1-Region des ER α . Indes findet keine Interaktion zwischen Caveolin-1 und dem ER β statt. Caveolin-1 verstärkt daher auch nicht die ER β -vermittelte Transkription von Oestrogen-Zielgenen.

1.4.4.2 Modulation der nicht-genomischen Aktivität des ER durch Caveolin-1

Während die genomischen Effekte Oestrogens nach einer bestimmten Latenz-Zeit bedingt durch *de novo* Proteinsynthesen auftreten, induziert Oestrogen auch schnelle, nicht-genomische Effekte. Dazu gehören die Freisetzung von Neurotransmittern (Becker 1999) oder die Aktivierung der MAP-Kinasekaskade (Manthey et al. 2001) in neuronalen Zellsystemen. Über den Wirkmechanismus dieser nicht-genomischen Effekte von Oestrogen herrscht noch weitgehend Unklarheit. Im Falle der MAP-Kinasen-Aktivierung durch Oestrogen wird das Vorhandensein eines mutmaßlichen ERs in der Zellmembran diskutiert, da selbst BSA-konjugierte Oestrogene, welche die Zellmembran nicht durchwandern können, die MEK-ERK Phosphorylierungskaskade auslösen (Beyer et al. 2003). Nachdem viele Komponenten des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges in Caveolae lokalisiert sind, scheint eine Lokalisation des membranären ER in dieser Domäne denkbar. Tatsächlich wurde ein ER α -Subtyp immunozytochemisch in Caveolae von Endothelzellen entdeckt (Kim et al. 1999). Somit kommt Caveolin-1 eine mögliche Rolle als Transportmolekül für ER α an die Zellmembran zu. Wird Caveolin-1 in MCF-7-Zellen überexprimiert, transloziert ein bestimmter Anteil der ER-Moleküle vom Zytoplasma zur Zellmembran (Razandi et al. 2002).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Caveolin-1 zum einen die genomischen Effekte des ER α verstärkt, zum anderen aber auch an der Regulation der nicht-genomischen Effekte von Oestrogen beteiligt ist. Bewerkstelligt wird dies vermutlich durch eine von Caveolin-1

induzierte Umverteilung des zytoplasmatischen Pools an ERs in Richtung des Zellkerns oder der Zellmembran.

In den folgenden Abschnitten sollen die genomischen sowie nicht genomischen, teils ER-vermittelten Effekte Oestrogens mit dem Überbegriff des Oestrogen-Systems beschrieben werden.

1.5 Funktionen der Caveolae und Caveoline im ZNS und PNS

1.5.1 Funktionen der Caveolae und Caveoline in glialen Zellen

Die bisher publizierten Studien zur Caveolin-Expression und Funktion in glialen Zellen trugen bislang eher deskriptiven Charakter. Es konnte gezeigt werden, daß bestimmte Proteine wie der ABC-Transporter P-Glykoprotein (Ronaldson et al. 2004) oder der Endothelin-Rezeptor ET_B-R (Teixeira et al. 1999) in Caveolae von primären Astrozyten angereichert sind. P-Glykoprotein (P-gp) ist eine ATP-getriebene Membranpumpe, die den Efflux einer großen Bandbreite strukturell weitgehend unverwandter, niedermolekularer Substanzen wie aromatischer Kohlenwasserstoffe katalysiert. Caveolin-1 interagiert mit P-gp, wobei Mutationen im Caveolin-Bindungsmotiv von P-gp eine reduzierte Interaktion mit Caveolin-1 zur Folge hat. Die daraus resultierende Dissoziation von Caveolin-1 und P-gp führt parallel zu einer gesteigerten Transportaktivität dieser Membranpumpe (Jodoin et al. 2003; Ronaldson et al. 2004).

Der Endothelin-Rezeptor ET_B-R ist ein Sieben-Helix-Transmembran-Rezeptor, der nach Bindung von Endothelin-1 eine Aktivierung der MAP-Kinasekaskade initiiert, deren Komponenten in Caveolae lokalisiert sind. Endothelin-1 reguliert unter anderem Prozesse der Proliferation und der funktionellen Astrozyten-Differenzierung. Zuletzt sei die nachgewiesene Expression von Caveolin-1 in Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems erwähnt (Mikol et al. 1999). Es wird angenommen, daß Caveolin-1 aufgrund seiner Eigenschaft als Cholesterol-Interaktionspartner die Synthese von Myelin zur Herstellung der Myelinscheide positiv beeinflusst.

1.5.2 Vermutete Funktionen der Caveoline in Neuronen

Von wenigen Ausnahmen abgesehen wurden die meisten Studien zur Funktionalität der Caveoline in neuronalen Zellen unter Verwendung von Zelllinien durchgeführt. So konnte gezeigt werden, daß Neurotrophin-Rezeptoren (TrkA, p75^{NTR}) (Peiro et al. 2000), metabotropen Glutamat-Rezeptoren (Burgueno et al. 2003) sowie das Amyloid-Precursor Protein (APP) (Ikezu et al. 1998a) in Caveolae angereichert sind. Das Neurotrophin NGF (Nerve Growth Factor) aktiviert die Rezeptor-Tyrosin-Kinase TrkA und induziert dadurch die Differenzierung von PC12-Zellen. Diese Differenzierung kann durch die gleichzeitige Überexpression von Caveolin-1 blockiert werden (Bilderback et al. 1999). Caveolin-1 bindet

an den TrkA-Rezeptor und reduziert das Ausmaß seiner Autophosphorylierung nach NGF-Behandlung.

Beachtenswert ist auch die Rolle der Caveoline für die Prozessierung von APP. APP ist ein Transmembranprotein, welches mittels α -, β -, oder γ -Sekretasen enzymatisch gespalten wird, sodaß verschieden große Protein-Fragmente als Abbauprodukte oder mutmaßliche Signalmoleküle entstehen (De Strooper und Annaert 2000). Erfolgt die Spaltung durch eine β - und eine γ -Sekretase, wird das amyloide Peptid A β freigesetzt (Vassar und Citron 2000). Dieses findet man in großen Mengen in Ablagerungen, den sogenannten senilen Plaques, in Gehirnen mit Alzheimer-Pathologie wieder. Alternativ kann APP auch durch die α -Sekretase prozessiert werden, die APP innerhalb der A β -Sequenz schneidet und damit die Entstehung der A β -Peptide verhindert. Caveolin-1 fördert die α -Sekretase-vermittelte Prozessierung von APP, welches direkt mit Caveolin-1 interagiert (Ikezu et al. 1998a). Dagegen wurde für Caveolin-3 eine stimulatorische Wirkung auf die β -Sekretase nachgewiesen (Nishiyama et al. 1999). Interessanterweise wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie eine signifikante Erhöhung der Caveolin-1-Spiegel im Gehirn von Alzheimer-Patienten detektiert (Gaudreault et al. 2004). Ob dieser Befund für die Pathogenese der Krankheit von Bedeutung ist, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Viele der genannten Studien zur Funktion der Caveoline im ZNS befinden sich in sehr frühen Stadien, und ihre physiologische Relevanz wurde in den meisten Fällen nicht überprüft. Dennoch wird deutlich, daß prinzipielle Wirkmechanismen von Caveolinen, wie die Inhibition von Rezeptoren und die Modulation von enzymatischen Aktivitäten, auch auf zelluläre Systeme des ZNS übertragbar sind.

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die physiologischen Funktionen der Caveoline sind komplex und beinhalten die Biogenese der Caveolae, die Regulation des intrazellulären Cholesterols-Transports sowie die basale und pleiotrope Kontrolle der Aktivität zahlreicher Signaltransduktionswege. Die von Caveolinen beeinflussten zellulären Prozesse sind, abhängig vom extrazellulären Milieu und Differenzierungsgrad, steten zeitlich-räumlichen Änderungen unterworfen. Häufig sind diese dynamischen Änderungen auf eine Modulation in der Caveolin-Expressionsrate zurückzuführen. So wird zum Beispiel die Caveolin-Expression in Fibroblasten im Laufe der Zellalterung hochreguliert. Daraus resultiert eine Erhöhung der Anzahl von Caveolae und die Desensibilisierung bestimmter Signaltransduktionswege (Park et al. 2000). Andererseits sinken die Caveolin-Spiegel bei der Genese bestimmter Tumoren, ein Vorgang, der den entarteten Phänotyp vermutlich weiter stabilisiert (Razani et al. 2001b). Diese Beispiele verdeutlichen, daß die Kontrolle der Caveolin-Genregulation für die Funktionalität dieser Proteine und für die Ausprägung der von ihnen vermittelten zellbiologischen Effekte eine entscheidende Rolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit sollten erstmalig unterschiedliche Mechanismen der Caveolin-Genregulation in neuronalen Zellsystemen untersucht werden, wobei auch die Übertragbarkeit der Ergebnisse in andere Zellmodelle berücksichtigt wurde. Zunächst wurden unter Verwendung einer Neuroblastom-Zelllinie, primärer Astrozyten-Kulturen, sowie eines *in vivo* Tiermodells verschiedene Klassen von Faktoren ermittelt, welche die Caveolin-Expression beeinflussen. Hierbei wurden Oestrogen als Steroidhormon und seine nukleären Rezeptoren, der Botenstoff zyklisches AMP (cAMP) sowie der aus der EGF-Familie stammende Wachstumsfaktor TGF α identifiziert. Es handelt sich mithin um Faktoren, die charakteristische Aufgaben in den analysierten Zellsystemen erfüllen und selbst in einem funktionellen Zusammenhang mit Caveolae und den Caveolinen stehen. Darüber hinaus sollten die molekularbiologischen Mechanismen der veränderten Caveolin-Genexpression unter Beachtung epigenetischer Faktoren sowie spezifischer Signaltransduktionskaskaden untersucht werden. Ein besonderes Gewicht wurde auf DNA-Methylierungs-abhängige Genregulationsmechanismen gelegt.

Schließlich sollten erste deskriptive Studien zur Beschaffenheit der Caveolae in neuronalen Systemen erfolgen. Ein in Gliazellen spezifisch exprimiertes Protein, der Glutamat-Transporter GLT-1, wurde in Lipid Rafts von Astrozyten nachgewiesen, welche sich von Caveolae-Rafts unterscheiden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

17 β -Oestradiol	Sigma, St. Louis, USA
100 bp DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Agarose	PeqLab, Erlangen
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
APS	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Agar	Difco Lab, Detroit, USA
β -Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
ECL	Amersham, Braunschweig
D19 Developer	Kodak, Stuttgart
Dibutyryl-cAMP	Sigma, Taufkirchen
dNTPs	Peqlab, Erlangen
Dulbecco's PBS	Gibco, Paisley, Schottland
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
F12	Gibco, Paisley, Schottland
Ficoll 400	Sigma, Taufkirchen
Fixierungslösung	Kodak, Stuttgart
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Paisley, Schottland
Forskolin	Biotrend, Köln
G418	Calbiochem, Frankfurt
Gentamycin	Gibco Paisley, Schottland
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Gö6983	Calbiochem, Frankfurt

Hank's buffered saline solution (HBSS)	Gibco Paisley, Schottland
HEPES	Serva, Heidelberg
Pferdeserum	Gibco, Paisley, Schottland
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Luciferin	Roche, Penzberg
LY294002	Calbiochem, Frankfurt
DMEM	Gibco Paisley, Schottland
Methanol	Merck, Darmstadt
Methyl- β -Cyclodextrin	Sigma, Taufkirchen
MgCl ₂	Merck/Gibco, Darmstadt
MnCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaN ₃	Merck, Darmstadt
N2-Supplement	Gibco, Paisley, Schottland
Oligo dT ₂₃ Primer	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin-/Streptomycin-Lösung	Bio Whittaker, Rockland, USA
PCR Primer	Interactiva, Ulm
Poly-L-Ornithin	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Rainbow Protein-Marker	Biorad, München
Rapid Hyb Buffer	Amersham, Freiburg
RbCl ₂	Merck, Darmstadt
Rinderalbumin	Sigma, Taufkirchen
SDS	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Select Pepton 140	Gibco, Paisley, Schottland
Select Yeast Extract	Gibco, Paisley, Schottland
Stripped Rinderserum	HyClone Pierce Bioscience, Bonn
TEMED	Merck, Darmstadt

TGF α	Gibco, Paisley, Schottland
Trichostatin A	Sigma, Taufkirchen
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Gibco, Paisley, Schottland
Trypsin/EDTA	Gibco, Paisley, Schottland
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
U0126	Calbiochem, San Diego, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma, Taufkirchen
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylen	Serva, Heidelberg

2.1.2 Geräte

Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Szintillationszähler	Beckman, Krefeld
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Image Master VDS Software	Pharmacia
iQ Real-Time-PCR Thermozykler	Biorad, München
Kryostat HM 500 OM	Microm, Walldorf
Luminometer	Wallac Inc.
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Thermo Labsystems, Ulm
Mini Protean III, Western Blotting System	BioRad, München
PCR DNA Thermozykler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	inoLab, Weilheim
Power Pack 300	BioRad, München
Power Pack 200	BioRad, München
Spektrophotometer	Beckmann
Trans-Blot	BioRad, München
Sub-CellGT Agarose Gel Elektrophorese System	BioRad, München
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckmann, Krefeld
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

2.1.3 Weitere Verbrauchsmaterialien

Gel-Blotting Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Hybond N ⁺ Nylontransfermembran	Amersham, Freiburg
pH-Papier	Merck, Darmstadt
Polaroid-Sofortbildfilme Typ 667	Polaroid, Cambridge, UK
Potran Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart

2.1.4 Kits

Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit	Stratagene, Amsterdam, NL
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Bonn
Blood & Cell Culture DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
CpGenome Modification Kit	Intergen, Oxford, UK
Omniscript Reverse Transcriptase	Qiagen, Hilden
Megaprime DNA Labelling Kit	Amersham, Freiburg
pGEM-T Easy Vector System II	Promega, Mannheim
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Prolong Antifade	Molecular Probes
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rat Neuron Nucleofactor Kit	Amaxa, Köln
Superfect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
SYBR Green Supermix	Biorad, München
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Orton Southgate, UK

2.1.5 Enzyme - allgemein

Proteinase K	Amresco, Solon, USA
RNase-freie DNase	Qiagen, Hilden
Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6 Restriktions-Endonukleasen

<i>Enzym</i>	<i>Puffer</i>	<i>Inkubationstemp.</i>
<i>Bam</i> H I	NEB2 + BSA	37 °C
<i>Hpa</i> II	NEB1	37 °C
<i>Msp</i> I	NEB2	37 °C
<i>Taq</i> I	NEB2 + BSA	65 °C

Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme und die für den Restriktionsverdau eingesetzten Puffer und Temperaturen. Die Enzyme wurden über New England Biolabs (Frankfurt a. Main) bezogen.

2.1.7 Plasmide

ERE-Luciferase (zur Verfügung gestellt von Pierre Chambon)

pIRES-ER α (zur Verfügung gestellt von Dr. D. Manthey)

pIRES-ER β (zur Verfügung gestellt von Dr. D. Manthey)

pIRES-ER α/β (zur Verfügung gestellt von Dr. D. Manthey)

pEGFP-N1 (Clontech, Heidelberg)

2.1.8 Bakterienstamm

E.coli DH5 α

2.1.9 Primärantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung WB/IF</i>
Actin	Santa Cruz	Ziege	1:1000
Caveolin-1	BD-Transduction Lab	Maus	1:500/1:100
Caveolin-1	BD-Transduction Lab	Kaninchen	1:100 (IF)
Caveolin-2	BD-Transduction Lab	Maus	1:1000/1:100
EGF-Rezeptor	Santa Cruz	Kaninchen	1:200
ERK1/2	BD-Transduction Lab	Kaninchen	1:500
pERK1/2	BD-Transduction Lab	Maus	1:500
GFAP	DakoCytomation	Kaninchen	1:500/1:200
GLT-1	Chemicon	Meerschweinchen	1:5000
GLT-1	Dr. Rothstein	Kaninchen	1:100 (IF)

2.1.10 Sekundärantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Verdünnung WB/IF</i>
anti-Maus	Jackson Immunolab	HRP	1:5000 (WB)
anti-Kaninchen	Jackson Immunolab	HRP	1:10000 (WB)
anti-Ziege	Jackson Immunolab	HRP	1:10000 (WB)

anti-Meerschweinchen	Jackson Immunolab	HRP	1:3000 (WB)
anti-Maus	Jackson Immunolab	Cy2/Cy3	1:200 (IF)
anti-Kaninchen	Jackson Immunolab	Cy2/Cy3	1:200 (IF)
anti-Maus	VectorLab	biotinyliert	1:400 (IC)

2.1.11 Oligonukleotide

Die Anlagerungstemperatur T_A der Primer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_A = T_M(\text{Schmelztemperatur}) + 3 \text{ }^\circ\text{C},$$

wobei $T_M = 69,3 \text{ }^\circ\text{C} + 0,41 \times (\text{GC-Gehalt in } \%) - (650/\text{Primerlänge})$

Primersequenzen für die Bisulfit-Sequenzierung

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>	T_A °C	<i>Acces. Nr.</i>	<i>Nukl.-P.</i>
cav1prom-1s	TGTGTATTTTGTAAATATGGTATAATTTG	58	AJ133269	181027
cav1prom-1as	CCATCTCTACCTTAAAACACAT	58	AJ133269	181380
cav1prom-3s	GGATAGGGTAGGATTGTGGATT	58	AJ133269	181428
cav1prom-3as	CACATCCCCAAAATTCTAACA	58	AJ133269	181703

Primersequenzen für die RT-PCR-Analyse

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>	T_A °C	<i>Acces. Nr.</i>	<i>Nukleotid-P.</i>
actin-s	CTACAATGAGCTGCGTGTGGC	58	BC_002409	347
actin-as	CAGGTCCAGACGCAGGATGGC	58	BC_002409	619
hr cav1-1s	GACTTTGAAGATGTGATTGC	60	XM_004967	224
hr cav1-1as	AGATGGAATAGACACGGCTG	60	XM_004967	476
cav2-F	GACGTACAGCTTTCATGGAC	60	XM_004966	45
cav2-R	GGCTGACAGAAGAGAAGCATC	60	XM_004966	489
RatCav2-1s	CAGTGTCGTCGACTACACAG	60	AF_439780	65
RatCav2-1as	TCCAGATGTGCAGACAGCTG	60	AF_439780	340
hER α -2s	AGATCTTCGACATGCTGCTG	60	NM_000125	1628
hER α -2as	CACTTCATGCTGTACAGATG	60	NM_000125	1949
rhER β -s	GAGGCCTCCATGATGATGTC	58	NM_001437	1288
rhER β -as	TCTCCAGCAGCAGGTCATAC	58	NM_001437	1898
CGA-1s	GAGTCCACTTGCTGTGTAGC	62	NM_000735	339
CGA-1as	ACAAGTACTGCAGTGGCACG	62	NM_000735	435
DNMT1-3s	CTGGAGATCTCCTACAACGG	62	NM_001379	4387
DNMT1-3as	TCATGGTGGGTATAACCGCAG	62	NM_001379	4619
DNMT3A-1s	AGATCATGTACGTCGGGGAC	62	AF331856	2256
DNMT3A-1as	AGGGTTGGACTCGAGAAATC	60	AF331856	2547
DNMT3B-3s	CAGTCTTACTGCACTGTGTG	60	AF331857	1744
DNMT3B-3as	GCTGGATTCACATTTGAGAG	58	AF331857	2300

Primersequenzen für die Herstellung der LINE-1-Sonde

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>T_A °C</i>	<i>Accession Nr.</i>	<i>Nukleotid-P.</i>
L1-2s	AAATTACTCTGAGCTACGGG	58	M80345	1059
L1-1as	CGAGAGATCCACTGTTAGTC	58	M80345	1672

2.1.12 Zelllinien und stabile Transfektanten

<i>Zelllinie/Name</i>	<i>Zelltyp</i>	<i>Transfiziert mit</i>	<i>Bezug/ATCC-Nummer</i>
SK-N-MC	Neuroblastoma	-	HTB-10
SK01		pIRES	Dr. Dieter Manthey
SK-ER α /16		pER α cDNA	Dr. Dieter Manthey
SK-ER β 10		pER β cDNA	Dr. Dieter Manthey
SK-ER α / β 10		pER α / β cDNA	Dr. Dieter Manthey
MCF-7	Mamma-Karzinom	-	HTB-22

2.1.13 Tiere

Sprague Dawley-Ratten (SD-Ratten) wurden aus der lokalen Tierhaltung des Instituts für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universität Mainz bezogen.

2.1.14 Zusammensetzung allgemein verwendeter Puffer

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

150 mM NaCl
 20 mM Na₂HPO₄
 20 mM NaH₂PO₄
 pH 7.4

Phosphat-gepufferte Salzlösung mit TWEEN 20 (PBS/Tween)

PBS
 0.05 % (v/v) Tween 20
 pH 7.4

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

50 mM Tris-HCl
 150 mM NaCl
 pH 7.4

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien

Adhärente SK-N-MC- und MCF-7-Zellen wurden in 2-10 ml Medium (DMEM, 10% FBS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin) in geeigneten Kulturschalen ausplattiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer Kohlenstoffdioxid-Konzentration von 5%. Phenolrot als pH-Indikator zeigte verbrauchtes und durch den Zellstoffwechsel angesäuertes Medium an. Das Passagieren der Zellen wurde unter Verwendung einer Trypsin/EDTA-Lösung durchgeführt. Die Selektion auf die stabilen SK-ER-Zellklone fand unter Zusatz von 2 µg/ml G418 zum Kulturmedium statt.

SK-N-MC-Zellen wurden bei entsprechender Oestrogen-Stimulation einen Tag vor Expositionsbeginn in DMEM mit Aktivkohle-behandelten FBS überführt.

2.2.1.2 Etablierung astroglialer Primärkulturen

Die Präparation astroglialer Zellen erfolgte im Wesentlichen nach Franke (Franke et al. 1998). Kortex, Mittelhirn, Striatum oder Kleinhirn wurden aus den Gehirnen von Ratten am ersten nach deren Geburt (P1) in HBSS, 7 mM Hepes pH 7,4 bei 4°C herauspräpariert und für 20 min mit 0,1 % (m/v) Trypsin in Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem PBS bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Gewebe in HBSS/10% FBS überführt, um die Trypsin-Aktivität zu inhibieren. Die Gewebe wurden mit 10 ml und 5 ml Pipetten schonend durch Auf- und Ab-Pipettieren dissoziiert. Anschließend wurden die Zellen bei 400 g für 5 min zentrifugiert und im finalen Kulturmedium (MEM supplementiert mit 10% Pferdeserum) resuspendiert. Die Zellen wurden auf 10 cm-Zellkulturschalen ausplattiert, die zuvor für 30 min mit Poly-L-Ornithin (0,1 mg/ml) inkubiert wurden. Die Kultivierung der Glia-Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre. Nach der dritten Passage wurden die Zellen in N₂-haltiges MEM/F12(1:1)-Medium überführt.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierfür verdünnte man 10 µl einer Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau in PBS zur Unterscheidung lebender und toter Zellen. Die Zellzahl errechnet sich wie folgt:

Zellzahl pro ml = Mittelwert der 4 Großquadrate · Verdünnungsfaktor · 10⁴

10⁴ = Umrechnungsfaktor auf 1 ml

Verdünnungsfaktor = Verdünnung mit Trypanblau

2.2.1.4 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Reporterplasmiden

Zur Verifizierung der Funktionalität von ER α bzw. ER β in eukaryontischen Zellen wurden diese transient mit einem Reportervektor transfiziert. Als Reporter wurde das Enzym Luciferase eingesetzt, dessen Aktivität *in vitro* durch eine Biolumineszenzreaktion in den Zelllysaten gemessen werden kann. Stromaufwärts von der codierenden Sequenz des Reportergens befinden sich die Promoterelemente mit 3 Oestrogen-responsiven Elementen (ERE).

In Vorbereitung zur Transfektion wurden die Zellen in 24-Well-Platten in phenolrotfreiem Medium mit Aktivkohle/Dextran-behandeltem FBS subkultiviert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 60% erreicht hatten, wurde die Transfektion unter Verwendung des Superfect Transfection Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Pro Transfektionsansatz und Well wurden 1 μ g Plasmid-DNA mit 50 μ l serumfreiem Medium gemischt, 2 μ l Superfect-Reagenz zugegeben, 5 s gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz in ein Well einer 24-Well-Platte pipettiert und für 3 h bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde der Transfektionsansatz abgesaugt und durch 500 μ l Medium supplementiert mit gestrippten Serum ersetzt. Für die Messung der positiven Oestrogen-Antwort wurde dem Medium 10^{-8} M 17 β -Oestradiol zugesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde der Luciferase-Reporter-Assay durchgeführt.

2.2.1.5 Luciferase-Reporter-Assay

In der im vorigen Abschnitt genannten Biolumineszenzreaktion wandelt das Reporterenzym Luciferase das Substrat Luciferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und Mg²⁺ in Oxyluciferin und CO₂ um. Hierbei wird Licht der Wellenlänge von 562 nm emittiert.

Die Zellen wurden mit 150 μ l Lysispuffer pro Well lysiert, und die Suspension wurde für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden je 50 μ l in eine 96-Well-Platte übertragen und mit 50 μ l ATP-Lösung gemischt. Die Messung der Lichtemission erfolgte nach Zugabe von 100 μ l Luciferin-Substratlösung in einem Luminometer.

<i>Lysispuffer</i>	0,25 M KH ₂ PO ₄ , pH 7,8 1% Triton
<i>ATP-Lösung</i>	0,1 M KH ₂ PO ₄ , pH 7,8 5 mM ATP 10 mM MgCl ₂
<i>D-Luciferin</i>	10 mM D-Luciferin 70 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,8 28% Methanol

2.2.2 Immunologische Protein-Nachweisverfahren

2.2.2.1 Western-Blot-Analyse

2.2.2.1.1 Protein-Präparation und Quantifizierung

Zum Ernten von Proteinen wurden adhärenente Zellen aus subkonfluenten 6 oder 10 cm Kulturschalen zuerst mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 100 µl -200 µl Lysispuffer mechanisch von den Zellkulturschalen geschabt. Dem Lysispuffer wurden kurz vor Gebrauch Protease-Inhibitoren (Aprotinin, PMSF) zugefügt, um die Proteine vor proteolytischen Abbau zu schützen. Die lysierten Zellen wurden kurz sonifiziert und anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Proteinproben wurden generell bei -80°C aufbewahrt.

<i>Lysispuffer</i>	60 mM Tris-HCl, pH 6,8
	2% SDS
	10% Saccharose
	5 µg/ml Aprotinin
	10 mM PMSF

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte nach der BCA-Methode der Firma Pierce, wobei Serumalbumin als Standard diente. Die Protein-Proben (jeweils 5 µl) wurden mit je 45 µl Lysispuffer verdünnt und das BCA-Reagenz nach den Angaben des Herstellers hinzugefügt. Die Proben wurden bei 60°C für 30 min inkubiert, um anschließend die optischen Dichten bei 562 nm zu messen. Die Werte wurden gegen eine Serumalbumin-Standard-Kurve verglichen, welche Konzentrationen bis zu 20 mg/ml BSA abdeckte.

2.2.2.1.2 Detergenz-freie Präparation von Lipid Rafts/Caveolae

Primäre Astrozyten, adhärenent auf 10 cm Zellkulturschalen gewachsen, wurden mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml Homogenisierungspuffer von der Oberfläche der Kulturschale abgeschabt. Die Zellen wurden homogenisiert (Dounce Homogenisator) und anschließend zweimal für 15 s sonifiziert. Die homogenisierte Zellprobe wurde bei 800 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der hieraus resultierende post-nukleäre Überstand wurde für eine weitere Stunde bei 4°C und 100.000 g zentrifugiert. Das erhaltene Sediment repräsentierte die Membranfraktion, welche in 250 µl TBS gelöst und mit einem gleichen Volumen einer 80% (m/v) Saccharose-Lösung gemischt wurde. Die entstandene Lösung wurde in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und mit 1450 µl einer 30% (m/v) sowie 250 µl einer 5% (m/v) Saccharose-Lösung überschichtet. Dieser Stufengradient wurde für 2 h bei 4°C und 55.000 rpm unter Verwendung eines Swing-Out-Rotors (TLS 55, Beckmann) zentrifugiert. Der Gradient wurde in 200 µl-Fractionen von der Spitze bis zum Boden abgenommen, welche direkt in die Western-Blot-Analyse eingesetzt wurden.

<i>Homogenisierungspuffer</i>	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 5 mM EDTA 5 mg/ml PMSF 1 mM Na-Orthovanadat
-------------------------------	--

2.2.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteintransfer

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die von Laemmli (1970) beschriebene Methode der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt.

Die Auftrennung erfolgte hierbei unter Verwendung der Miniblot-Kammer der Firma Biorad. Nach dem Ansetzen und Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol wurde nach vollendeter Polymerisation abgenommen und der verbliebene Raum mit dem Sammelgelansatz aufgefüllt. Die Protein-Proben wurden mit 2 x Auftragspuffer gemischt, 5 min bei 95°C aufgekocht und anschließend als 5-20 µg Aliquots pro Spur auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde der Rainbowmarker der Firma Biorad eingesetzt. Der Sammelgellauf erfolgte bei 100 Volt und der Trenngellauf bei 150 Volt in 1 x SDS-Laufpuffer.

<i>Trenngel</i>	0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 8%-12% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 0,1% SDS 0,05% TEMED 0,1% APS
-----------------	---

<i>Sammelgel</i>	0,25 M Tris-HCl, pH 6,8 5% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 0,1% SDS 0,05% TEMED 0,1% APS
------------------	--

<i>Auftragspuffer</i>	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 4% SDS 10% Glycerol 2% β-Mercaptoethanol 0,006% Bromphenolblau
-----------------------	--

<i>1 x SDS-Laufpuffer</i>	5 mM Tris-HCl, pH 8,3 50 mM Glycin 0,1% SDS
---------------------------	---

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch einen elektrophoretischen *Semi Dry*-Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und für die nachfolgende Immundetektion fixiert. Zunächst wurden drei Lagen Filterpapier mit Transferpuffer getränkt und auf die angefeuchtete Anode der Transferkammer gelegt. Auf diese Schicht folgten die Nitrocellulose-Membran sowie das Gel. Abgeschlossen wurde die Transfereinheit durch drei mit Transferpuffer getränkte Filter. Auf diese wurde die Kathodenelektrode aufgesetzt. Der Transfer erfolgte in einer Biorad-Blotkammer in Transferpuffer bei 200 mA für 0,5 – 1,5 h bei Raumtemperatur. Zur Kontrolle des Proteintransfers auf die Trägermembran sowie die gleichmäßige Proteinbeladung der Spuren wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung angefärbt. Hierzu wurde die Membran nach dem Transfer kurz in destilliertem Wasser bewegt und anschließend für 5 min in 1x Ponceau S inkubiert.

Transferpuffer 39 mM Glycin
 48 mM Tris
 0,037% SDS
 20% Methanol

1x Ponceau S 0,02% Ponceau
 0,3% Trichlor-Säure
 0,3% Sulphosalicylsäure

2.2.2.1.4 Detektion der Membran-gebundenen Antigene

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran zunächst für 1 h in Blockierungspuffer (TBS/0,05% Tween mit 5% m/v Trockenmilchpulver) bei Raumtemperatur bewegt. Es folgte die Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers (s. Material) in TBS/Tween über Nacht bei 4°C. Zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS/Tween gewaschen, und anschließend für 1 h mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Wasch-Schritten erfolgte die Detektion des sekundären Antikörpers mit Hilfe des ECL-Protokolls der Firma Amersham. Die Membran wurde mit 1 ml ECL-Lösung beträufelt, in Folie eingepackt und für 5 s bis 60 min auf einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.2.2 Immunozytochemie

Mit Hilfe der Immunozytochemie werden Proteine *in situ* in Einzelzellen detektiert. Astrogliale- oder SK-N-MC-Zellen wurden zunächst auf einem poly-L-Ornithin-beschichteten Deckglas unter Standardbedingungen kultiviert, bis eine Konfluenz von ca. 60-80% erreicht wurde. Zur Vorbereitung der Immundetektion wurden die Zellen kurz mit PBS

gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur für 45 min in 4% Paraformaldehyd fixiert. Es folgte die Entfernung des Paraformaldehyds und die Permeabilisierung der Zellen durch zweimaliges und fünfminütiges Waschen mit PBS/0,1% Tween. Nach der Permeabilisierung wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation der Zellen mit PBS/10% FBS abgesättigt. Daraufhin wurden die Zellen 2 h in einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in PBS/Tween ergänzt mit 10% FBS inkubiert, anschließend dreimal 5 min in PBS/Tween gewaschen und schließlich 1 h mit dem sekundären, Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper (Fluoreszenzfarbstoffe Cy2, Cy3 oder Cy5) in PBS/Tween supplementiert mit 10% FBS bei Raumtemperatur inkubiert. Der nicht gebundene sekundäre Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS/Tween entfernt. Zuletzt wurden die Zellen in Prolong Antifade von Molecular Probes eingebettet und das Deckglas mit Nagellack auf den Objektträgern fixiert. Prolong Antifade verhindert hierbei das rasche Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs nach erfolgter Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge. Nach Aushärten des Nagellacks wurden die Präparate unter einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

2.2.2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie erlaubt die Detektion von Proteinen *in situ* im Gewebe. Hirnschnitte wurden bei -20°C aufbewahrt und vor der Färbung für 5 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Schnitte wurden in 4% (m/v) Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert und anschließend in 2% (v/v) Triton X-100 in PBS (PBS/T) permeabilisiert. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren und endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren, wurden die Schnitte in 0,9% (v/v) Wasserstoffperoxid in Ethanol/PBS (1:1) für 30 min inkubiert, gefolgt von einer einstündigen Inkubation in 4% (w/v) BSA in PBS. Die Schnitte wurden dann mit einer 1:100 Verdünnung der primären Antikörper in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem ungebundene primäre Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS/T entfernt wurden, erfolgte eine zweistündige Inkubation mit einer 1:400 Verdünnung des biotinylierten sekundären Antikörpers in 1% BSA/PBS. Die Zugabe eines Avidin-gekoppelten Meerrettich-Peroxidase-Komplexes ermöglichte eine Signalverstärkung. Die Immundetektion wurde mit Hilfe eines Diaminobenzidin Färbungs-Kits (Vectastain ABC, Vector Laboratories) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Färbungsreaktion wurde nach 2 min durch Zugabe von Wasser gestoppt, die Schnitte wurden in einer Ethanol-Reihe dehydriert, in Xylene gereinigt, eingebettet und fixiert.

2.2.3 Nukleinsäure-Analytik

2.2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen

Genomische DNA wurde mittels Aussalzmethode aus eukaryontischen Zellen isoliert. Dazu wurden ca. 1×10^7 – 5×10^7 Zellen mit PBS gewaschen und in 3 ml Kernlysepuffer aufgenommen. Zell- und Kernmembranen wurden durch Zugabe von 100 μ l einer 20% SDS-Lösung und starkem Schütteln aufgeschlossen. Nach Zugabe von 2 mg/ml Proteinase K folgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C, um einen möglichst vollständigen proteolytischen Abbau der Zellproteine zu gewährleisten. Peptidreste wurden anschließend durch Hinzufügen von 1 ml 5 M NaCl und halbstündiger Inkubation auf Eis ausgefällt. In der folgenden Zentrifugation für 15 min bei 3.000 rpm wurden die Peptide sedimentiert. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit 0,6 vol Isopropanol versetzt und vorsichtig gemischt. Die fadenförmige ausgefallene DNA wurde abzentrifugiert und in zwei Schritten mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung der DNA wurde diese in Abhängigkeit ihrer Menge in 100 μ l – μ l 300 TE Puffer gelöst.

Kernlysepuffer 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 400 mM NaCl
 10 mM EDTA

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 0,1 mM EDTA

2.2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Minipräparation von Plasmid-DNA wurde ausgehend von 5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur der Qiagen Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Plasmid-Isolation basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterien und der anschließenden spezifischen Bindung der Plasmid-DNA an Silika-Säulen unter Hochsalzbedingungen, welche final mit TE-Puffer von der Säule eluiert wird.

2.2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

RNA ist im Vergleich zu DNA anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse, daher verlangt das Arbeiten mit RNA spezielle Vorkehrungen. Zum Lösen der RNA wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes, bidestilliertes Wasser verwendet. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikation eines Histidinrestes im aktiven Zentrum.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde der RNA RT-PCR Miniprep Kit von Stratagene verwendet. Der Kit erlaubt die Phenol/Chloroform-freie Gewinnung von RNA über ein

Silika-Säulenprinzip. Eine zusätzliche 15-minütige Behandlung mit DNasen bei 37°C verringerte die Gefahr von DNA-Kontaminationen.

2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA basiert auf der Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm.

Die Messung wurde in Quarzküvetten gegen destilliertes Wasser als Nullwert durchgeführt. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde unter der Berücksichtigung des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt.

2.2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion PCR

Die PCR ist eine Methode zur zyklischen Amplifikation spezifischer Nukleinsäureabschnitte. Dieser Prozess wird katalysiert durch die hitzestabile Taq-Polymerase.

Die PCR wurde unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt: ein PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt neben 1 ng - 5 ng Plasmid-DNA, 100 ng genomischer DNA oder 1 µl – 5 µl cDNA jeweils 15 pmol der beiden Primer, 2,5 µl des 10 x PCR-Puffers, jeweils 0,5 µl 10 mM dNTP, MgCl₂ in einer Endkonzentration von 1 mM bis 3 mM sowie 0,5 U Taq-Polymerase. Der Ansatz wurde mit bidestillierten Wasser auf 25 µl aufgefüllt.

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Biometra) durchgeführt: zum Starten der PCR wurde die DNA 5 - 10 min bei 95°C denaturiert. Es folgte die Anlagerung der Primer auf eine durch die Primer festgelegte Temperatur (30-50 s). Nach dem Anlagerungsschritt wurde die Temperatur auf 72°C erhöht, dem Aktivitätsoptimum der Taq-Polymerase. Die Extensionszeit betrug 30-60 s. Im nächsten Schritt wurde erneut für 30-60 s auf 94°C geheizt, um die DNA für die folgende Primeranlagerung in die Einzelstränge zu zerlegen. Es wurden insgesamt 20-35 Zyklen durchgeführt. Zuletzt erfolgte eine fünfminütige Endextension bei 72°C zur Vervollständigung teilweise synthetisierter DNA-Stränge.

Bei der Etablierung jeder PCR mit neuen Primerpaaren wurden verschiedene MgCl₂-Konzentrationen von 1 mM bis 4 mM ausgetestet sowie verschiedene Anlagerungstemperaturen in einem Temperaturgradienten.

2.2.3.6 PCR-Analyse von Transformandenklonen

Um den Erfolg einer Plasmid-Transformation von Bakterien zu testen, wurde eine PCR mit einem Primerpaar durchgeführt, welches homolog zu spezifischen Sequenzen des klonierten DNA-Fragments war. Hierzu wurden Bakterien-Einzelkolonien steril von Kulturplatten in jeweils 100 µl bidestillierten Wasser resuspendiert. Aliquots der

Bakteriensuspension von 1 µl wurden der PCR-Analyse unterzogen. Die 94°C Anfangsdenaturierung wurde hierbei auf 10 min verlängert, um die Bakterienzellen aufzuschließen.

2.2.3.7 Real-Time-PCR-Analyse

Zur Quantifizierung von Genexpressionsänderungen auf Transkriptionsebene wurden Real-Time-PCR-Analysen durchgeführt. Als Matrize für die actin-PCR diente unverdünnte cDNA, für die caveolin-1-Amplifikation im Verhältnis 1:10 verdünnte cDNA. Das Endvolumen der PCR-Betrag 25 µl, welche neben der zu analysierenden cDNA 12,5 µl PCR-Reagenz-Mischung (SYBR Green Supermix, Biorad) sowie 100 pmol von Sinn- und Gegensinn Primern beinhalteten. Die PCR-Reagenz-Mischung enthielt 2 x PCR-Puffer, dNTPs sowie die Taq-Polymerase. Die PCR wurde im iCycler der Firma Biorad durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren hierbei vergleichbar mit denen der konventionellen PCR. Aus den Amplifikationskurven wurde derjenige Zyklus („Threshold Cycle“ C_T) ermittelt, nach dem die Amplifikation des PCR-Produkts in die exponentielle Phase überging. Mittels der C_T -Werte wurden anschließend die relativen Expressionsunterschiede X zweier Proben normalisiert auf actin wie folgt berechnet (Livak and Schmittgen 2001):

$$X = 2^{-\Delta\Delta C_T}, \text{ wobei } \Delta\Delta C_T = ((C_{T \text{ Caveolin-1}} - C_{T \text{ Actin}})_{\text{Stimulation}} - ((C_{T \text{ Caveolin-1}} - C_{T \text{ Actin}})_{\text{Kontrolle}})$$

Die PCR wurde jeweils in Dubletts angelegt.

2.2.3.8 Amplifikation von RNA (RT-PCR)

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren.

Zunächst wurde die RNA in cDNA umgeschrieben, da RNA nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase genutzt werden kann. Gesamt-RNA (500 ng – 2 µg) wurde mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 5 min bei 75°C im Thermocycler inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Der Reaktionsansatz wurde anschließend sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der RNA-Moleküle zu verhindern. Zum gleichen Ansatz wurden 2 µl 10 x Puffer (Qiagen), 2 µl 5 mM dNTP, 2 µl 10 µmol Oligo-dT₁₅-Primer, 0,25 µl RNase-Inhibitor (40 U, Promega), und 4 U Reverse Transkriptase (Omniscript, Qiagen) in einem Envolumen von 20 µl gegeben. Eine Kontrolle, die keine Reverse Transkriptase enthielt, wurde zum Nachweis auf Kontamination mit DNA mitgeführt. Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Die cDNA wurde schließlich bei -20 °C aufbewahrt.

Jeweils 1-2 μl der cDNA wurden in die anschließende PCR zum Nachweis und relativen Quantifizierung bestimmter Zielgene eingesetzt.

2.2.3.9 Analyse der genomischen DNA-Methylierung

2.2.3.9.1 Differentielle Modifikation mit Bisulfit

Die Bisulfit-Methode bietet ein hohes Auflösungsvermögen zur Bestimmung des Methylierungsstatus von DNA-Cytosinresten. Bisulfit katalysiert die Konversion von Cytosin zu Uracil in Einzelstrang-DNA. Methylierte Cytosinreste sind von dieser Konversion hingegen nicht betroffen und aus diesem Grunde von den nicht-methylierten Cytosinen unterscheidbar.

Für die Bisulfit-Reaktion wurde der CpG Genome DNA Modification Kit der Firma Intergen gemäß Kit-Anleitung verwendet. Initial wurde 1 μg genomische DNA eingesetzt und bei basischem pH für 10 min bei 37°C denaturiert, da die Konversion nur an Einzelstrang-Nukleinsäuren katalysiert wird. Nach der Denaturierung wurde unter saurem pH für 16 h bei 50°C die Bisulfit-Reaktion durchgeführt. Hierbei werden unter der katalytischen Wirkung von Bisulfit Cytosinreste hydrolytisch zu Uracil desaminiert. Nach Beendigung der Bisulfit-Reaktion wurde die DNA in 30 μl TE aufgenommen.

Im nächsten Schritt wurde der untersuchte DNA-Abschnitt mittels PCR zu spezifischen dsDNA-Fragmenten amplifiziert. Der PCR-Ansatz wurde auf einem Agarosegel aufgetragen, um anschließend das PCR-Produkt zu isolieren. Letzteres wurde in den pGEM-T-Vektor der Firma Promega subkloniert, und ausgewählte Subklone wurden sequenziert (TopLab, Martinsried).

2.2.3.9.2 Restriktionsanalyse

Restriktionsenzyme katalysieren die endonukleolytische Spaltung an palindromischen DNA-Erkennungssequenzen und ermöglichen somit die Charakterisierung bestimmter DNA-Abschnitte.

Für den Restriktionsverdau von PCR-Amplifikaten wurden 5 μl – 20 μl PCR-Ansatz mit max. 1 Einheit (1 U) Restriktionsenzym unter den für das entsprechende Enzym am besten geeigneten Pufferbedingungen inkubiert.

Bei der Restriktionsanalyse genomischer DNA im Rahmen der Southern-Blot-Analyse wurden 10 μg DNA mit 15 U Restriktions-Endonukleasen und 4 μl des entsprechenden 10 x Puffers in einem Gesamtvolumen von 40 μl mindestens 8 h inkubiert.

2.2.3.10 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

In Agarosegelen lassen sich, abhängig von der Konzentration der Agarose, DNA-Fragmente über einen weiten Größenbereich auftrennen.

Für die Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose unter Aufkochen in 1 x TAE Laufpuffer gelöst. Für die Auftrennung restringierter genomischer DNA für Southern-Blot-Analysen wurde der Hochsalzpuffer TPE verwendet. Die DNA wurde mit Hilfe des Bromphenolblau-haltigen 6 x Auftragspuffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte horizontal und geflutet in 1 x TAE bzw. 1 x TPE Puffer. Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen wurden 10 µl eines Längenstandards auf jedes Gel mitaufgetragen. Die Sichtbarmachung der DNA erfolgte durch Zusatz des organischen DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid zum Laufpuffer. Ethidiumbromid wird durch UV-Licht der Wellenlänge 254-366 nm angeregt. Die Gele wurden unter UV-Beleuchtung fotografiert.

<i>1 x TAE Laufpuffer</i>	44,5 mM Tris pH 7,5 45,5 mM Borsäure 1 mM EDTA
<i>1 x TPE Hochsalzpuffer</i>	36 mM Tris 30 mM Na ₂ PO ₄ 1 mM EDTA
<i>6 x Auftragspuffer</i>	10 mM Tris-HCl pH 8,0 50% (v/v) Ficoll 0,006% Bromphenolblau

Um PCR-Produkte von der Matrize oder von Primerdimeren zu trennen, wurden die Proben zuerst gelelektrophoretisch aufgetrennt und das entsprechende Gelsegment unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus den Agaroseblöckchen erfolgte mit Hilfe des Gel Extraction-Kits der Firma Qiagen. Die DNA-Isolierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.11 Southern-Blot-Analyse

2.2.3.11.1 Nukleinsäure-Transfer

Zur weiteren Untersuchung der durch Gelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäuren wurden diese auf eine Membran transferiert. Die auf diese Weise immobilisierte DNA konnte so durch anschließende Hybridisierung in der Southern-Blot-Analyse identifiziert und charakterisiert werden.

Um die Transfereffizienz der DNA auf die Trägermembran zu erhöhen, wurde das Agarosegel zunächst im Depurinierungsschritt für 10 min in 0,25 N HCl bewegt. Diese Reaktion führt zur partiellen Abspaltung von Purinen. So werden während der anschließenden 30-minütigen Inkubation in Denaturierungspuffer Phosphodiesterbindungen an den apurinischen Stellen gespalten und Strangbrüche induziert. Außerdem liegt die DNA nach der Inkubation einzelsträngig vor, eine Notwendigkeit für die spätere Hybridisierung.

Der DNA-Transfer erfolgte in 0,4 N NaOH-Transferlösung mittels Kapillarkräfte über Nacht. Hierzu wurden ein mit einem Puffer-Reservoir in Verbindung stehendes Saugpapier unter das Agarosegel gelegt, darauf die positiv geladene Membran (Hybond N+, Amersham) und schließlich mehrere Schichten von Saugpapier. Die Transferlösung wurde nun durch das Gel und die Membran gesaugt, wobei die Nukleinsäuren auf die positiv geladene Membran übertragen wurden.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Nylonmembran zur Neutralisation 5 min in 2x SSC bewegt und an der Luft getrocknet.

<i>Denaturierungspuffer</i>	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
<i>20 x SSC</i>	3 M NaCl 300 mM Na-Citrat pH 7,0

2.2.3.11.2 Sondenherstellung

Für die Detektion des Retrotransposon-Elements LINE-1 mittels Southern-Blot-Analyse wurde eine radioaktiv-markierte LINE-1-Sonde unter Verwendung des Megaprime DNA Labelling Kits der Firma Amersham hergestellt. Hierzu wurden 100 ng Sonden-DNA, welche als PCR-generierte LINE-1-Teilsequenz subkloniert im pGEM T Easy-Vektor vorlag, mit 5 µl Primer gemischt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurde der Ansatz mit bidestilliertem Wasser auf 35 µl aufgefüllt und mit 10 µl 5 x Labelling Puffer, 3 µl [³²P]dCTP sowie 2 µl Klenow-Fragment versetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei 37°C inkubiert, und die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA-Lösung gestoppt. Danach wurde die markierte Probe mit 345 µl TE-Puffer auf den Filter einer mit TE-Puffer-äquilibrierten Säule gegeben. Die Säule wurde weitere fünf Mal mit jeweils 400 µl TE-Puffer eluiert. Die Fraktionen wurden aufgefangen und deren Radioaktivitätsgehalt mit einem Szintillationszähler (Beckman) gemessen. Die zweite Fraktion enthielt hierbei die markierte Sonde, wobei die Gesamt-Radioaktivität zur Bestimmung der Markierungseffizienz herangezogen wurde. Zur Präzipitation der Sonden-DNA wurde die zweite Fraktion mit 5 µl Träger-DNA, 40 µl 3 M

Na-Acetat-Lösung und 800 µl Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C gelagert. Am folgenden Tag wurde die Probe 15 min bei Raumtemperatur und 14.000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 150 µl einer 0,1% SDS-Lösung resuspendiert.

2.2.3.11.3 Hybridisierung mit der radioaktiv-markierten Sonde

Die Membran mit der immobilisierten DNA wurde mit Wasser angefeuchtet und daraufhin in einer Hybridisierungsflasche mit 65°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer (Rapid Hyb Puffer, Amersham) für 20 min äquilibriert. In der Zwischenzeit wurde die radioaktiv-markierte Sonde für 5 min bei 95°C aufgekocht, bevor 75 µl der Sondenlösung zum Prähybridisierungspuffer in die Flasche gegeben wurde. Nach einer zweistündigen Hybridisierung bei 65°C wurden die Blots zur Entfernung überschüssiger Sonde mit 2 x SSC gewaschen. Zur Detektion der Signale wurden die Membranen in Plastikfolie eingeschweißt und autoradiographiert.

2.2.3.12 Klonierung von PCR-Amplifikaten in den pGEM Teasy Vector

Für die Subklonierung von Amplifikaten wurde der pGEM-T Easy Kit von Promega nach Angaben des Herstellers verwendet. Der enthaltene Vektor liegt linearisiert vor und weist zwei überhängende Thymidinreste auf. Das PCR-Amplifikat trägt jeweils am 3'-Ende einen zum linearisierten Vektor komplementären, einzelnen Adenosin-Rest, der aufgrund der Templat-unabhängigen terminalen Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase angehängt wird. Die T4 DNA-Ligase katalysiert die Ligation des Amplifikats mit dem linearisierten Vektor.

2.2.4 Mikrobiologische Methoden

2.2.4.1 Herstellung chemisch kompetenter E.coli-Zellen

Eine Übernachtskultur (5 µl) eines chemisch kompetenten Bakterienstammes (DH5α) wurden in 5 ml YT++ Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Diese Vorkultur wurde in 50 ml YT++ Medium übertragen und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45-0,55 vermehrt. Danach wurde die Kultur rasch durch eine fünfminütige Inkubation auf Eis abgekühlt und anschließend für 5 min bei 4°C und 5.000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml Tfb I-Lösung auf Eis resuspendiert und für 10 min inkubiert. Danach wurde die Suspension erneut für 5 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Sediment in 2 ml Tfb II-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde zu je 200 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

<i>TfB I</i>	30 mM Kaliumacetat, pH 5,8 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerol
<i>TfB II</i>	10 mM Na-MOPS, pH 7,4 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15% (v/v) Glycerol

2.2.4.2 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl chemisch-kompetenter E.coli-Zellen auf Eis aufgetaut. Zu jedem Aliquot wurden 10 µl Ligationsansatz pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis und anschließend der Hitzeschock für 90 s bei 42°C. Nach der Hitzeschock-Behandlung wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 400 µl vorgewärmten LB-Medium versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Entsprechende Aliquots wurden auf antibiotikum-haltigen LB-Platten ausplattiert.

<i>LB-Medium</i>	1,0% (w/v) Select Pepton 140 0,5% (w/v) Select Yeast Extract 17 mM NaCl ₂ pH 7,5
------------------	--

2.2.4.3 Kultivierung von Bakterien

Für die Anzucht von Bakterien in Schüttelkulturen und anschließende Plasmid-Minipräparation wurden 5 ml LB-Medium mit 40 µg/ml Ampicillin versetzt.

Für die Herstellung von Agarplatten wurden zuerst 1,2 g Bactoagar in 100 ml LB-Medium gelöst und autoklaviert. Vor Zugabe von 100 µl einer 40 mg/ml Ampicillin-Stammlösung ließ man die Bactoagar-Lösung auf 60°C abkühlen. Die so vorbereitete Lösung wurde luftblasenfrei in die Petrischalen gegossen.

Erfolgte eine Blau/Weiß-Selektion zur Identifizierung von pGEM-Plasmiden, die eine Insertion im LacZ Reporter-Gen trugen, wurden vor dem Ausplattieren der Bakterien pro Platte 30 µl einer X-Gal-Substrat-Lösung (40 mg/ml) aufgetragen und für mindestens 10 min bei 37°C inkubiert.

3 Ergebnisse

3.1 Modulation der Caveolin-Expression durch das Oestrogen-System

Caveoline interagieren mit Komponenten des Oestrogen-Rezeptor-Systems und modulieren dessen genomische sowie nicht-genomische Aktivität (Razandi et al. 2002; Schlegel et al. 1999). Es sollte daher überprüft werden, ob das Steroidhormon Oestrogen und seine nukleären Rezeptoren ihrerseits Auswirkungen auf die Caveolin-Expression im Sinne einer positiven oder negativen Rückkopplung zeigen.

3.1.1 Der ER-Status von SK-N-MC-Zellen und stabilen ER-Transfektanten

Unter Verwendung der humanen Neuroblastom-Zelllinie SK-N-MC sollte der Einfluss des Oestrogen/Oestrogen-Rezeptor-(ER)-Systems auf die Caveolin-Expression untersucht werden. Die Zelllinie SK-N-MC wurde deshalb gewählt, weil sie zum einen keine funktionellen endogenen ERs exprimiert (Manthey et al. 2001), zum anderen jedoch hohe Konzentrationen von Caveolin-1- und Caveolin-2-Proteinen aufweist. Durch die ektopische Expression von ER α / β können somit Schlüsse über mögliche differentielle Effekte dieser Steroid-Rezeptor-Subtypen auf die Caveolin-Expression gezogen werden.

Zu diesem Zweck wurden SK-N-MC-Zellen etabliert, die entweder ER α (SK-ER α), ER β (SK-ER β) oder beide Rezeptor-Subtypen (SK-ER α / β) stabil überexprimierten (s. S. 21). Hierzu wurde die ER α - oder ER β -cDNA unter Deletion der *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES) in den bi-cistronischen eukaryontischen Expressionsvektors pIRES kloniert. Im Falle der Co-Expression wurde die ER β -cDNA in die multiple Klonierungsstelle A (MCS A) und die ER α -cDNA in die MCS B von pIRES kloniert. Gesteuert wird die Expression durch den Immediate-Early-Promoter des Zytomegalie-Virus (CMV). Zudem kodiert pIRES für eine Neomycin-Resistenz, auf welche die Zellen nach erfolgter Transfektion selektioniert wurden. Drei Wochen nach der Transfektion wurden einzelne Zellen klonal expandiert.

Zunächst wurden die stabil transfizierten Zellen auf ihren ER-Status überprüft. Der Vergleich erfolgte hierbei mit SK-N-MC-Zellen, die lediglich mit dem Leervektor pIRES transfiziert wurden (SK01). Für die Charakterisierung der Transfektanten wurden RT-PCR-Analysen und Luciferase-Reporter-Assays durchgeführt.

Für die RT-PCR-Analyse wurden ER-Subtyp-spezifische Primerpaare generiert, welche ausschließlich an ER α -beziehungsweise ER β -cDNA hybridisieren. Die Primeranlagerungsstellen befanden sich jeweils in der für die Hormonbindungsdomäne kodierenden cDNA-Sequenz (Abb. 4).

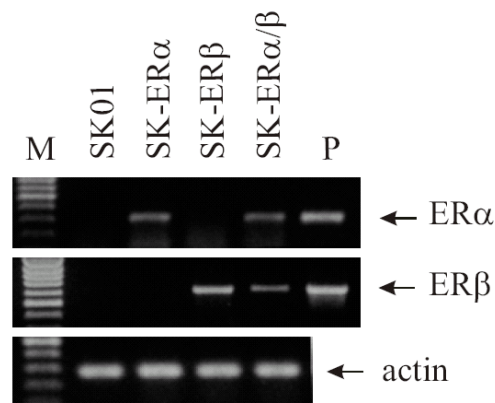


Abb. 4. RT-PCR-Analyse zur Ermittlung des ER-Status in parentalen SK-N-MC-Zellen (SK01) sowie ER-Transfektanten. Für die Detektion von ER-mRNA-Transkripten wurde cDNA mit ER α - und ER β -spezifischen Primern in 25 PCR-Zyklen amplifiziert. Je 20 μ l der PCR-Produkte wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Die berechnete Länge der cDNA-Amplifikate betrug für ER α 323 bp und für ER β 611 bp. Als Positivkontrolle (P) diente die Amplifikation der jeweiligen ER-Expressionsplasmid-DNA mit den entsprechenden Primerpaaren. Sowohl Qualität als auch Quantität der cDNA wurde mittels Amplifikation von actin-cDNA überprüft, deren berechnete Länge 275 bp betrug. M bezeichnet den Längenstandard.

In den MOCK-transfizierten SK01-Zellen konnte unter den gewählten PCR-Bedingungen kein Amplifikat für ER α - und ER β -Transkripte nachgewiesen werden. Dagegen zeigten SK-ER α - sowie SK-ER α/β -Zellen ein spezifisches PCR-Produkt der erwarteten Größe unter Verwendung des ER α -spezifischen Primerpaars. ER β -mRNA Transkripte wurden dagegen durch den Einsatz von ER β -spezifischen Primern in SK-ER β - und SK-ER α/β -Zellen detektiert. Die RT-PCR-Analyse bewies damit die Abwesenheit von ER α - und ER β -Transkripten in parentalen, Leervektor-transfizierten SK01-Zellen sowie die transkriptionelle Expression der ER-Subtypen in den jeweiligen Transfektanten.

Die transkriptionelle Expression des ER gibt noch keinen Hinweis auf die Funktionalität des Steroid-Rezeptors als Transkriptionsfaktor in den analysierten Zellen. Auch Western-Blot-Analysen lassen lediglich Aussagen über die Größe des ektopisch exprimierten Genprodukts zu. Aus diesem Grunde wurden funktionelle Analysen mit Hilfe eines Luciferase-Reporter-Assays durchgeführt. Prinzipiell soll damit die Bindung des ER nach Hormonzugabe an bestimmte DNA-Elemente eines Promoters nachgewiesen werden. Der Promoter wird daraufhin aktiviert und induziert die Expression des nachgeschalteten Reportergens. Der Nachweis der Promoteraktivität erfolgt somit über die Syntheserate des Reportergenprodukts. Der in dieser Studie eingesetzte Reportervektor setzte sich aus der kodierenden Sequenz des Reportergens Luciferase und einem *Upstream*-gelegenen Minimal-Promoter zusammen, welcher drei Oestrogen-Responsive Elemente (EREs) enthielt. Die parentalen sowie ER-

überexprimierenden SK-Zellen wurden transient mit dem Reporterplasmid transfiziert. Für weitere 24 Stunden wurden die Zellen mit 10^{-8} M Oestrogen stimuliert. Nach Lyse der Zellen und Freisetzung des zytosolischen Enzyms Luciferase wurde der Umsatz des zugegebenen Substrats Luciferin luminometrisch gemessen (Abb. 5).

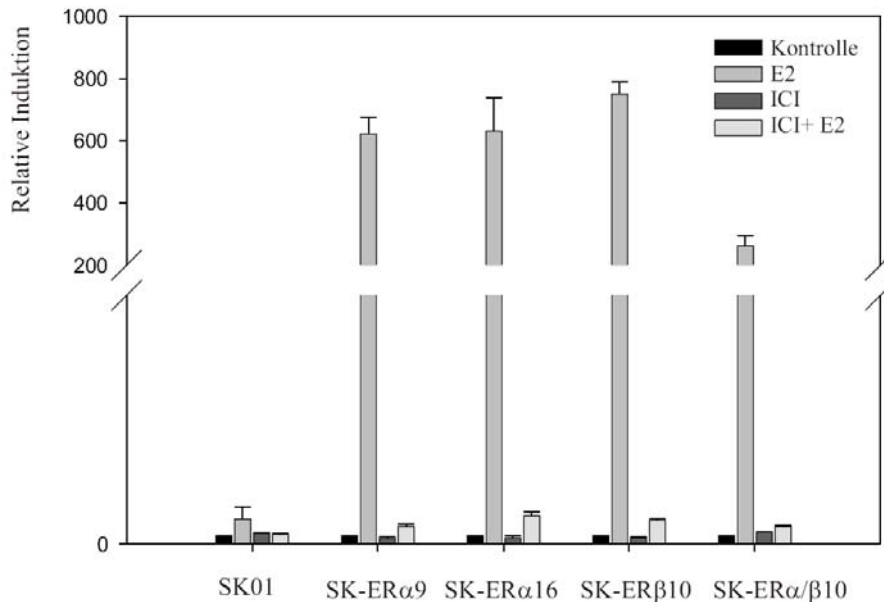


Abb. 5. Luciferase-Reporter-Assay zur Funktionalität der ER-Konstrukte in den Transfektanten. SK-Zellen (SK01, SK-ER α , SK-ER β , SK-ER α/β) wurden transient mit 1 μ g Reporterplasmid pro Well einer 24-Well-Platte transfiziert und für 24 h mit 10^{-8} M Oestrogen in An- oder Abwesenheit des ER-Antagonisten ICI 182 780 (10^{-5} M) stimuliert. Nach Lyse der Zellen und Messung der Luciferase-Aktivität, wurden die Werte mit der Proteinkonzentration des jeweiligen Wells abgeglichen und im Diagramm als relative Induktion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen aufgetragen. Die Transfektionseffizienz wurde mit einem β -Galactosidase-Reporter visuell ermittelt und ergab keine signifikanten Unterschiede in der Transfizierbarkeit der analysierten ER-Transfektanten (Daten nicht gezeigt).

Die Stimulation von SK01-Zellen mit Oestrogen zeigte wie erwartet keine signifikante Aktivierung des Reportergens. Dagegen wiesen Oestrogen-behandelte SK-ER α - und SK-ER β -Zellen eine 600-700-fache Aktivierung des Rezeptors im Vergleich zu den Oestrogen-unbehandelten Kontrollen auf. Die co-exprimierenden SK-ER α/β -Zellen nahmen mit einer ca. 250-fachen Induktion eine Zwischenstellung ein. Vergleich man die Basalaktivität des Reporters in Abwesenheit von Oestrogen, fiel eine Auto-Aktivierung des Rezeptors in ER α - und ER β -transfizierten Zellen auf, die um den Faktor 12-20 im Vergleich zu ER-negativen SK01-Zellen erhöht war (Daten nicht gezeigt). Obwohl der Luciferase-Reporter-Assay unter Verwendung Phenolrot-freiem Mediums sowie Aktivkohle-behandeltem und somit Steroid-freiem Serums durchgeführt wurde, konnte die basale Auto-Aktivierung des Rezeptors in den ER-Transfektanten ohne Zugabe des Liganden nicht vermieden werden. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß oestrogene Substanzen, wie beispielsweise „Weichmacher“, in geringen Konzentrationen in den erwähnten Zellkulturbedingungen auftreten.

Des Weiteren wurde der Einfluss eines potenten ER-Antagonisten, ICI 182 780, auf die Aktivierbarkeit des Rezeptors durch Oestrogen untersucht. Wurden die ER-Transfektanten gleichzeitig mit Oestrogen und ICI 182 780 behandelt, blockierte der ER-Antagonist vollständig die Oestrogen-vermittelte Aktivierung des Steroid-Rezeptors (Abb. 2). Außerdem führte die ICI-Behandlung zu einer Reduktion der Auto-Aktivierung des ER. Die Aktivierbarkeit des Rezeptors durch Oestrogen und seine Inhibition durch spezifische Antagonisten beweisen seine Funktionalität im betrachteten Zellsystem.

3.1.2 Suppression der Caveolin-1/-2 Expression durch ER α

Parentale SK-N-MC-Zellen exprimieren Caveolin-1 und Caveolin-2 auf hohem Niveau. Western-Blot-Analysen mit zellulären Lysaten von SK01 und ER-transfizierten Zellen (SK-ER α , SK-ER β , SK-ER α/β) ergaben, daß die ektopische Expression des ER α zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Caveolin-1- und Caveolin-2-Expression in SK-ER α -Zellen führt (Abb. 6). Dieser inhibitorische Effekt trat unabhängig von der Exposition mit dem Liganden Oestrogen auf, da selbst Oestrogen-unbehandelte SK-ER α -Zellen keine nachweisbaren Caveolin-1/-2-Proteinspiegel mehr aufwiesen. Dagegen schien die Überexpression von ER β oder die Co-Expression von ER α/β keine Veränderung in der Caveolin-Expressionsrate im Vergleich zu SK01-Zellen zu bewirken. Auch die Behandlung mit 10^{-8} M Oestrogen für 48 Stunden zeigte in SK01-, SK-ER β - und SK-ER α/β -Zellen keinen Effekt auf die Caveolin-Spiegel.

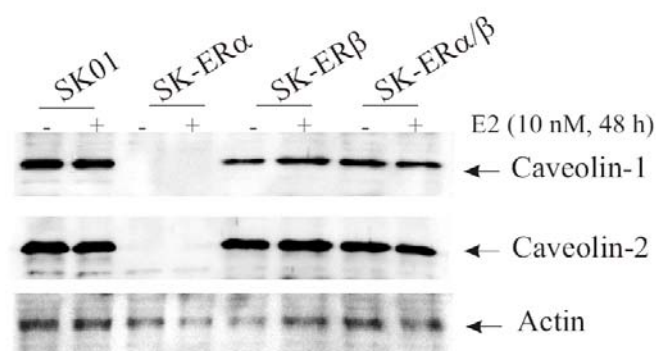


Abb. 6. Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Caveolin-Spiegel in SK01-, SK-ER α -, SK-ER β - und SK-ER α/β -Zellen. SK-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 10^{-8} M Oestrogen für 48 h kultiviert. Anschließend wurden Proteinlysate gewonnen, und 10 μ g Gesamtprotein wurden auf einem 12% PA-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte unter Verwendung Caveolin-1/-2-Subtyp-spezifischer Primärantikörper und Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper. Als Kontrolle für die Beladung des PA-Gels wurden die Membranen im Anschluß mit Actin-spezifischen Antikörpern inkubiert.

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus der Western-Blot-Analyse wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Unstimulierte SK01-, SK-ER α - und SK-ER β -Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Caveolin-1- oder Caveolin-2-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion des Cy3-Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpers ergab ein für Caveolin typisches subzelluläres Verteilungsmuster in SK01- und SK-ER β -Zellen (Abb. 7). Ein Großteil der Proteine wurde in der Zellmembran detektiert, wo sie eine ungleichmäßige, punktierte Lokalisation aufwiesen. Zudem erhielt man Signale im Zytoplasma, welche vermutlich die im endoplasmatischen Retikulum neu-synthetisierten Caveolin-Moleküle darstellten. Wie in den Western-Blot-Analysen konnten auch mittels Immunfluoreszenz kaum meßbare Caveolin-1- oder Caveolin-2-spezifische Signale in ER α -überexprimierenden Zellen (SK-ER α) gefunden werden. Aufgrund der nahezu vollständigen Suppression der Caveolin-1/-2-Expression durch ER α muß man von einer Rückbildung von Caveolae-Membrandomänen in SK-ER α -Zellen ausgehen.

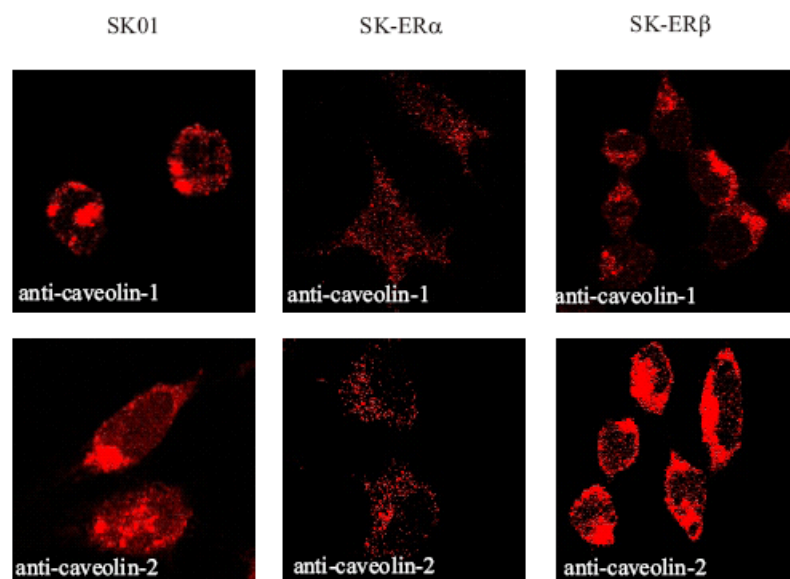


Abb. 7. Immunfluoreszenzfärbung zur subzellulären Lokalisation von Caveolin-1/-2 in SK01-, SK-ER α - und SK-ER β -Zellen. Unbehandelte SK-Zellen wurden fixiert und mit anti-Caveolin-1- und anti-Caveolin-2-Antikörpern inkubiert. Die Cy3-gekoppelten Zweitantikörper wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie visualisiert. Die Immunfärbungen zeigen jeweils eine 100-fache Vergrößerung der Zellen.

In den meisten Fällen wird die Expression der Caveoline über die Kontrolle ihrer Transkriptionsrate reguliert. Um herauszufinden, ob die reduzierten Caveolin-Proteinspiegel auf eine verminderte Caveolin-Gentranskription zurückzuführen sind, wurde eine semi-quantitative RT-PCR-Analyse durchgeführt. Aus Oestrogen-behandelten und unbehandelten SK01-, SK-ER α -, SK-ER β - sowie SK-ER α/β -Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA-umgeschrieben und anschließend für eine PCR verwendet. Die hierbei eingesetzten

Caveolin-1 und -2 Subtyp-spezifischen Primer generierten jeweils ein spezifisches PCR-Produkt der erwarteten Länge (Abb. 8). Es konnten hierbei keine Unterschiede in den Intensitäten der PCR-Banden beim Vergleich Oestrogen-behandelter und unbehandelter Zellen festgestellt werden. Dagegen konnten in ER α -überexprimierenden Zellen keine mRNA-Transkripte für Caveolin-1 und Caveolin-2 mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Auch hier handelte es sich somit um einen ligand-unabhängigen inhibitorischen Effekt des ER α auf die Caveolin-Transkription.

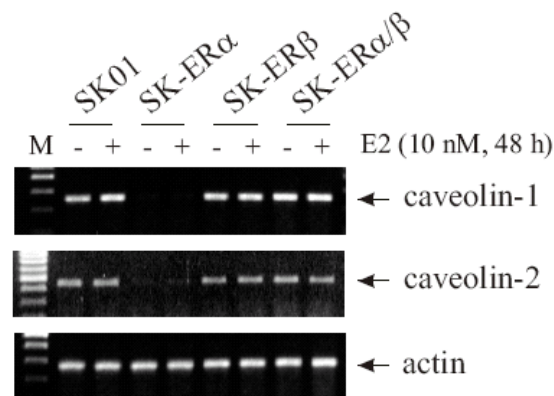


Abb. 8. RT-PCR-Analyse zur Bestimmung der Expressionsstärke der Caveolin-1/-2 Transkription in SK01-, SK-ER α -, SK-ER β - sowie SK-ER α/β -Zellen. Nach 48-stündiger Oestrogen-Behandlung (10^{-8} M) oder Ethanol-Kontroll-Behandlung wurde Gesamt-RNA aus SK-Zellen isoliert und einer cDNA-Synthese unterzogen. Für die Detektion von Caveolin-mRNA-Transkripten wurde die cDNA mit Caveolin-1- und Caveolin-2-spezifischen Primern in 25 PCR-Zyklen amplifiziert. Je 20 μ l der PCR Produkte wurden auf ein 1,0% Agarosegel aufgetragen. Die berechnete Länge der cDNA-Amplifikate betrug für Caveolin-1 254 bp und für Caveolin-2 446 bp. Als Kontrolle für vergleichbare Konzentrationen initial eingesetzter cDNA diente die Amplifikation von actin-cDNA. M bezeichnet den Längenstandard.

Die gezeigten Ergebnisse belegen einen supprimierenden Effekt des ER α auf die Caveolin-1/-2-Expression in SK-ER α -Zellen. Die Inhibition erfolgt dabei auf Transkriptionsebene und findet auch in Abwesenheit des Steroid-Rezeptor-Liganden Oestrogen statt. Interessanterweise bewirkt die Co-Expression von ER β eine Aufhebung der inhibitorischen Effekte von ER α in SK-ER α/β -Zellen.

Die beobachtete ligand-unabhängige Wirkungsweise des ER α im Hinblick auf die Caveolin-Genexpression könnte neben der erhöhten Basalaktivität ein weiteres Indiz für das Vorliegen einer Auto-Aktivierung des Rezeptors sein. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Expression zweier klassischer Oestrogen-Zielgene, Trefoil-Faktor (pS2) und CGA (Chorion Gonatropin A), in SK01- und SK-ER α -Zellen verglichen. Beide Zielgene werden bekanntermaßen positiv durch ER α und Oestrogen reguliert (Roberts et al. 1988; Bieche et al. 2001). Eine semi-quantitative PCR mit pS2- und CGA-spezifischen Primern produzierte

spezifische Amplifikate ausgehend von cDNA, die aus Gesamt-RNA Oestrogen-behandelter und unbehalteter SK-ER α -Zellen hergestellt wurde (Abb. 9). Die Leervektor-transfizierten SK01-Zellen wiesen in der RT-PCR-Analyse keine nachweisbaren Transkripte für pS2 und CGA auf.

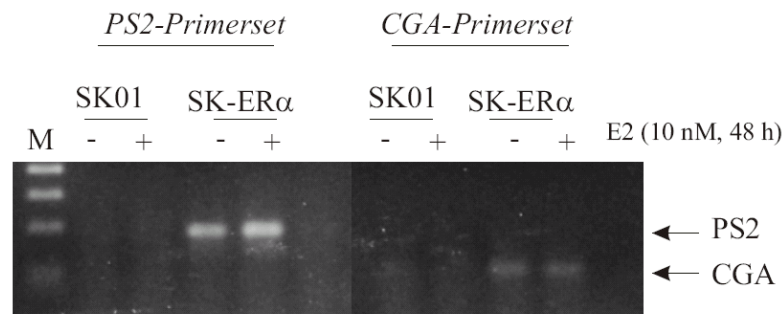


Abb. 9. RT-PCR-Analyse der pS2- und CGA-Expression in SK01- und SK-ER α -Zellen. Gesamt-RNA aus Oestrogen-behandelten (48 h, 10^{-8} M) und unbehalteten Zellen wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die Amplifikation der pS2-cDNA ergab ein errechnetes 196 bp Produkt, die der CGA-cDNA ein 96 bp Produkt unter Verwendung der entsprechenden Primer und 25 PCR-Zyklen. Jeweils 20 μ l der PCR-Ansätze wurden in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. M bezeichnet den Längenstandard.

Da die beobachtete Induktion dieser Oestrogen-Zielgene allein auf die ektopische Expression des ER α zurückzugehen scheint, kann auch in diesem Fall von einer ligand-unabhängigen Wirkungsweise des Rezeptors ausgegangen werden. Zu erklären wäre dieses Phänomen beispielsweise durch das relativ hohe Expressionsniveau des ER, verursacht durch den Einsatz des eukaryontischen Expressionsvektors pIRES, dessen Ziel-cDNA (ER α) unter der Kontrolle des starken viralen Promoters CMV steht.

Die ligand-unabhängigen Funktionen des ERs sind auch unter physiologischen Bedingungen von großer Relevanz. So wurden mehrere ER-Zielgene identifiziert, deren Expression positiv oder negativ mit der Expression des ER korreliert (Gruvberger et al. 2001).

Für die Regulation des Trefoil-Faktors pS2 wurde gezeigt, daß die ektopische Expression des ER α die Transkription von pS2 induziert und darüber hinaus eine Demethylierung bestimmter Bereiche des pS2-Promoters bewirkt (Martin et al. 1997). Die Demethylierung des Promoters hat eine Öffnung der Chromatinstruktur zur Folge, welches die Rekrutierung von weiteren Transkriptionsfaktoren erlaubt. Das neu entstandene Methylierungsmuster im pS2-Promoter kann daraufhin an die nächsten Zellgenerationen weitergegeben werden. Dieser epigenetische Prozess erlaubt eine dauerhafte Expressionsänderung des Zielgens, welche ursprünglich durch ER α initiiert wurde.

Die Beobachtung, daß selbst der potente ER-Antagonist ICI 182 780 die Caveolin-Expression in SK-ER α -Zellen nicht wiederherstellte (Daten nicht gezeigt), könnte auf eine dauerhafte Inaktivierung der Caveolin-Genexpression hinweisen, die epigenetische Ursachen hat.

3.1.3 Differentielle Methylierung des Caveolin-1 Promoters in SK-Zellklonen

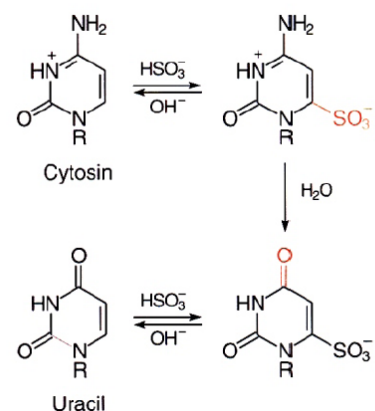
Die Methylierung bzw. Demethylierung bestimmter DNA-Abschnitte in Promoter-Sequenzen spielt bei epigenetischen Genregulationsmechanismen eine wichtige Rolle. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die sogenannten CpG-Inseln, welche eine Zielsequenz für die differentielle Methylierung darstellen. CpG-Inseln sind kurze, etwa 1 kb-lange, GC-reiche DNA-Sequenzen, die in den meisten Fällen am 5'-Ende von Vertebraten-Genen lokalisiert sind. Etwa 56% der Gene des menschlichen Genoms sind mit CpG-Inseln assoziiert (Antequera and Bird 1993), davon viele Haushaltsgene sowie ubiquitär exprimierte Gene. Per Definition weisen CpG-Inseln einen über 60% betragenden GC-Gehalt sowie eine hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden auf (Gardiner-Garden and Frommer 1987). Die überragende Mehrheit von CpG-Inseln ist unter Normalbedingungen nicht methyliert. Diese hypomethylierten DNA-Abschnitte zeigen in der Regel aktiv-transkribierte Gene an. Werden die Cytosinreste innerhalb der CpG-Dinukleotide jedoch am 5'-Kohlenstoffatom methyliert, eine Reaktion, die durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert wird, bewirkt dies oft den Verlust der transkriptionellen Aktivität der assoziierten Gene (Robertson and Wolffe 2000).

Im Falle der ER α -vermittelten Inhibition der Caveolin-1-Expression sollte die potentielle Beteiligung eines DNA-Methylierungs-abhängigen Stilllegungsmechanismus abgeklärt werden. Der Promoter des Caveolin-1-Gens zeigt die Charakteristika einer nach Frommer definierten CpG-Insel (Engelman et al. 1999a). Um die Korrelation zwischen transkriptioneller Aktivität und Promoter-Methylierungsgrad zu überprüfen, wurden in den verschiedenen SK-Zell-Klonen ausgewählte CpG-Dinukleotide des Caveolin-1-Promoters auf ihren Methylierungsstatus untersucht.

3.1.3.1 DNA-Bisulfit-Sequenzierung

Zur Bestimmung des Methylierungsstatus des Caveolin-1-Promoters wurde genomische DNA aus den entsprechenden Zellen isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen (Frommer et al. 1992). Durch die katalytische Wirkung von Bisulfit werden Cytosinreste der DNA hydrolytisch zu Uracilen desaminiert (Abb. 10).

Abb. 10. Bisulfit-Modifikation von Cytosin-Resten. Das C6-Atom eines zugänglichen Cytosins wird bei einer hohen NaHSO₃-Konzentration (3,0 M) und leicht sauren Bedingungen (pH 5,0) sulfoniert. Die Aminogruppe am C4-Atom wird dann spontan hydrolysiert und das Bisulfit-Molekül bei basischem pH freigesetzt. Auf diese Weise entsteht ein Uracilrest. Diese Reaktion kann nur an einzelsträngiger und unmethylierter DNA ablaufen.



Methylierte Cytosinreste sind jedoch von dieser Konversion ausgenommen und können dadurch von nicht-methylierten unterschieden werden. Dies geschieht durch die PCR-Amplifikation der zu analysierenden Promoter-Region unter Verwendung Bisulfit-modifizierter DNA als Matrize und anschließender Sequenzierung des PCR-Produkts. Ursprünglich unmethylierte Cytosine erscheinen im Sequenziergel als Thymin, wohingegen methylierte Cytosine auch als Cytosin-Signale auftreten. Die Primer, welche die zu analysierende Promoterregion flankieren, müssen im Wesentlichen zwei Kriterien erfüllen: zum einen dürfen die Primeranlagerungsstellen keine CpG-Dinukleotide enthalten, um eine Diskriminierung von methylierter versus unmethylierter DNA zu vermeiden. Zum anderen muss die Primersequenz der durch die Bisulfit-Behandlung konvertierten DNA-Sequenz angepasst werden.

In dieser Studie wurden zwei Abschnitte des Caveolin-1-Promoters amplifiziert, bezeichnet als Region A (Primerpaar CPM1-1s/1as) und B (Primerpaar CPM3-1s/1as). Bezogen auf das Translationsstartkodon ATG umspannt die Region A mit 7 CpG-Stellen die Nukleotid-Positionen -877 bis -525 und Region B mit 17 CpG-Stellen die Positionen -477 bis -202. Die CpG-Stellen wurden konsekutiv von 1 bis 24 stromabwärts durchnummeriert (Abb. 12).

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, gereinigt und direkt einer Sequenzierungsreaktion unterworfen. Wie die Ergebnisse der Sequenzierungsreaktion zeigten, konnte weder an den CpG-Stellen noch an den Cytosinen außerhalb der CpG-Stellen eine eindeutige Zuordnung für Cytosin- oder Thymin-Basen erfolgen. Generell wurden Peaks für beide Nukleotide mit unterschiedlichen Intensitäten gemessen (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für die auftretende Heterogenität in der DNA-Population liegt zum großen Teil in der Unvollständigkeit der Desaminierungsreaktion von Cytosin nach Uracil in distinkten DNA-Strängen. In der Praxis ist eine vollständige Bisulfit-Konversion nicht möglich, sodaß bestimmte Subpopulationen von DNA-Einzelsträngen von der Bisulfit-Modifikation ausgenommen sind.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden die PCR-Produkte zuerst in einen Sequenzierungsvektor (pGEM) subkloniert, um daraufhin lediglich Plasmid-Klone ursprünglich Bisulfit-konvertierter DNA zu sequenzieren. Abbildung 11 zeigt das Vorgehen zur Identifizierung konvertierter DNA-Subklone der Promoter-Region A. In einer Transformandenklon-Analyse wurden mittels PCR unter Verwendung des Primerpaars CPM1-1s/1as Bakterienkolonien auf das Vorhandensein der Promoter-Region A DNA-Sequenz in der Plasmid-DNA getestet. Positive Kolonien ergaben ein PCR-Produkt von 353 bp Länge. Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend einem *Bam* HI-Verdau unterzogen, um den Erfolg der initialen Bisulfit-Modifikation zu überprüfen. Bei erfolgreicher Bisulfit-Konversion wird die Erkennungssequenz dieses Restriktionsenzym (GGATCC → GGATTT) eliminiert, sodaß das PCR-Amplifikat nicht mehr durch *Bam* HI prozessiert

werden kann. Aus diesem Grund wurden die Subklone 1, 3, 4, und 5 als Klone ursprünglich konvertierter DNA identifiziert (Abb. 11). Dagegen wurden die Amplifikate der Klone 2 und 6 im *Bam* HI-Restriktionsverdau in ein 253 bp und 100 bp großes Fragment gespalten und konnten daher den nicht-konvertierten DNA-Klonen zugeordnet werden.

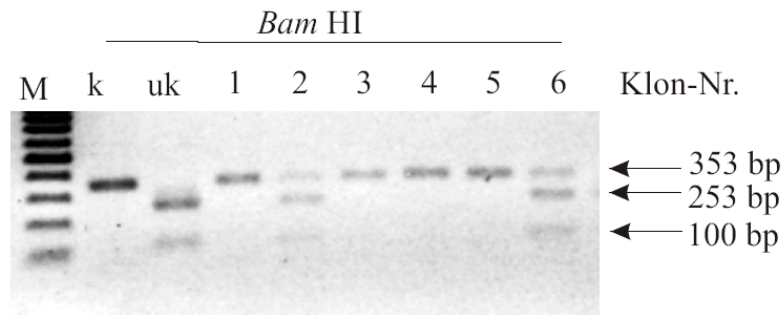


Abb. 11. Transformandenklon-Analyse der Promoter-Region A-Subklone im diagnostischen *Bam* HI-Verdau. Transformierte Bakterienkolonien wurden mittels PCR unter Verwendung des Primerpaars CPM1-1s/1as auf das Vorhandensein der Promoter-Region A-Sequenz untersucht. Die erhaltenen 353 bp-langen Amplifikate wurden daraufhin einer *Bam* HI Restriktion unterzogen. Auf ein 1,8% Agarosegel wurden die gesamten Restriktionsansätze aufgetragen. M bezeichnet den Längenstandard. Bei erfolgter *Bam* HI-Restriktion entstanden ein 253 bp und 100 bp langes Fragment (Klone 2 und 6; nicht-konvertiert). Nicht-restringiertes Amplifikat zeigte eine Länge von 353 bp (Klone 1, 3, 4, 5; konvertiert). k bezeichnet eine konvertierte Kontrollsequenz, uk eine unkonvertierte Kontrollsequenz.

Die Ermittlung des Anteils der im *Bam* HI-Verdau-negativen Subklone ergab eine Konversionseffizienz von über 90% nach Bisulfit-Modifikation. Subklone, die im *Bam* HI-Verdau negativ waren, wurden schließlich als Plasmid-Minipräparation isoliert und sequenziert.

Um ein möglichst exaktes Methylierungsprofil erstellen zu können, mussten für die untersuchten ER-Transfektanten (SK-ER α , SK-ER β und SK-ER α/β) sowie der parentalen SK01-Zellen jeweils mehrere Plasmid-Subklone sequenziert werden. Die Sequenzierreaktion ergab eine vollständige Konversion aller Cytosin-Reste zu Thymin außerhalb der CpG-Dinukleotide (Daten nicht gezeigt). Für jeden der sequenzierten Subklone wurde die An- oder Abwesenheit eines methylierten Cytosinrestes innerhalb aller CpG-Dinukleotide analysiert (Abb. 12).

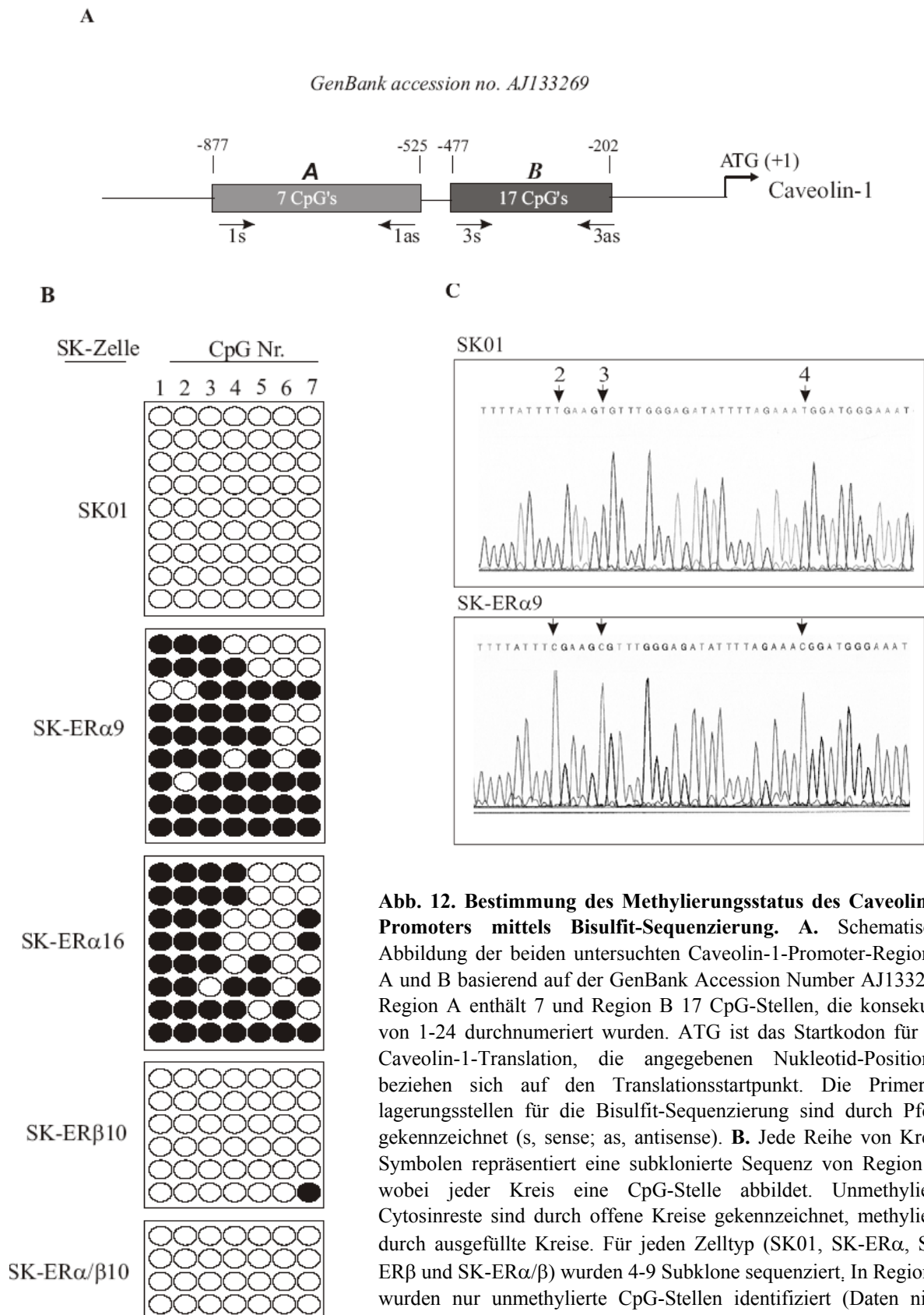


Abb. 12. Bestimmung des Methylierungsstatus des Caveolin-1-Promoters mittels Bisulfit-Sequenzierung. **A.** Schematische Abbildung der beiden untersuchten Caveolin-1-Promoter-Regionen A und B basierend auf der GenBank Accession Number AJ133269. Region A enthält 7 und Region B 17 CpG-Stellen, die konsekutiv von 1-24 durchnummeriert wurden. ATG ist das Startkodon für die Caveolin-1-Translation, die angegebenen Nukleotid-Positionen beziehen sich auf den Translationsstartpunkt. Die Primeranlagerungsstellen für die Bisulfit-Sequenzierung sind durch Pfeile gekennzeichnet (s, sense; as, antisense). **B.** Jede Reihe von Kreis-Symbolen repräsentiert eine subklonierte Sequenz von Region A, wobei jeder Kreis eine CpG-Stelle abbildet. Unmethylierte Cytosinreste sind durch offene Kreise gekennzeichnet, methylierte durch ausgefüllte Kreise. Für jeden Zelltyp (SK01, SK-ER α , SK-ER β und SK-ER α / β) wurden 4-9 Subklone sequenziert. In Region B wurden nur unmethylierte CpG-Stellen identifiziert (Daten nicht gezeigt). **C.** Zwei repräsentative Sequenzierreaktionen der Bisulfit-modifizierten DNA-Sequenz der Promoter-Region A aus SK01- und SK-ER α -Zellen zeigen die Konversion von Cytosin- zu Thyminresten mit Ausnahme der methylierten Cytosine in SK-ER α -Zellen. Die Pfeile heben 3 CpG- Stellen (Nr. 2, 3, 4) hervor, die denen in B) entsprechen.

SK-ER α -Zellen zeigen die Konversion von Cytosin- zu Thyminresten mit Ausnahme der methylierten Cytosine in SK-ER α -Zellen. Die Pfeile heben 3 CpG- Stellen (Nr. 2, 3, 4) hervor, die denen in B) entsprechen.

Die Bisulfit-Sequenzierung ergab, daß in Caveolin-1-exprimierenden SK01-, SK-ER β - und SK-ER α/β -Zellen alle der 24 analysierten CpG-Dinukleotide der Promoter-Regionen A und B in einem nicht-methylierten Zustand vorlagen. Ausnahme bildete ein Plasmid-Subklon von SK-ER β -Zellen, der ursprünglich einen methylierten Cytosinrest an CpG Nr. 7 anzeigte. Im Gegensatz dazu wurde in Caveolin-1-supprimierenden SK-ER α -Zellen eine starke Methylierung der CpG-Stellen Nr.1-7 der Region A gefunden. Dieses Ergebnis wurde für zwei unabhängige SK-ER α -Zellklone (SK-ER α 9 und α 16) erhalten. Die Häufigkeit des Anteils methylierten Cytosins in der Promoter-Region A lag zwischen 40% und 100%. An den CpG-Stellen Nr. 1-3 waren sogar 78 – 100% der analysierten Subklone ursprünglich methyliert. Interessanterweise wurde auch in SK-ER α -Zellen keine Methylierung der 17 CpG-Stellen des Promoterbereichs B beobachtet.

3.1.3.2 Diagnostischer *Taq* I-Restriktionsverdau

Die Bisulfit-Sequenzierung ist ein äußerst kostspieliges Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsstatus von CpG-Dinukleotiden, da eine Vielzahl von Subklonen für den Erhalt eines signifikanten Ergebnisses sequenziert werden müssen. Aus diesem Grund wurde eine weitere Methode zur Bestimmung des DNA-Methylierungsmusters entwickelt, welche zum einen die bisherigen Ergebnisse verifizieren, und zum anderen eine weniger aufwendige Alternative zur Bisulfit-Sequenzierung für folgende Versuche darstellen sollte.

Ausgangsbasis für den diagnostischen *Taq* I-Restriktionsverdau war Bisulfit-modifizierte DNA aus SK01-, SK-ER α -, SK-ER β - und SK-ER α/β -Zellen, die mit dem bereits beschriebenen Primerpaar zur Amplifikation der Promoter-Region A eingesetzt wurde. Das PCR-Produkt wurde anschließend einem diagnostischen *Taq* I-Restriktionsverdau unterzogen. Die Erkennungssequenz für *Taq* I beinhaltet ein CpG-Dinukleotid (TCCpGA). Liegt der darin enthaltene Cytosinrest unmethyliert im Genom vor, führt die Bisulfit-Konversion zu einem Verlust der *Taq* I-Schnittstelle. Ist dagegen die Cytosinbase methyliert, bleibt die Erkennungssequenz erhalten. In der Caveolin-1-Promoter-Region A ist CpG Nr. 2 Teil einer *Taq* I-Erkennungssequenz. Zusätzlich führt die Bisulfit-Modifikation zur Generierung einer zweiten *Taq* I-Erkennungssequenz, welche das CpG Nr. 5 beinhaltet (s. Anhang). Daher ließ nach gel-elektrophoretischer Auftrennung das resultierende *Taq* I-Restriktionsmuster Rückschlüsse auf den Methylierungsgrad der beiden betrachteten CpG-Stellen zu (Abb. 13). Der diagnostische Restriktionsverdau der Amplifikate, herrührend aus Bisulfit-behandelter DNA aus SK01-, SK-ER β - und SK-ER α/β -Zellen, zeigte nur eine nicht-restringierte Bande, die mit 353 bp der Länge des erwarteten PCR-Produkts entsprach. Für SK-ER β -Zellen wurde eine Bande bei ca. 70 bp identifiziert, welche vermutlich Primerdimere hervorgehend aus der PCR repräsentierten. Aufgrund des Fehlens der *Taq* I-Erkennungssequenz in den

Amplifikaten konnte von einer Hypomethylierung der entsprechenden CpG-Stellen Nr. 2 und 5 in SK01-, SK-ER β - und SK-ER α/β -Zellen ausgegangen werden. Dieses Resultat spiegelt die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung wieder. Die Amplifikation der Promoter-Region A, ausgehend von modifizierter DNA aus SK-ER α 9/16-Zellen, mit anschließender *Taq* I-Restriktion führte dagegen nach Gel-elektrophoretischer Auftrennung zu einem komplexen Bandenmuster. So wurde das 353 bp-lange Gesamt-Amplifikat in 243 bp, 167 bp, 110 bp und 76 bp Bruchstücke gespalten (Abb. 13). Damit wurde die Methylierung der CpG-Dinukleotide Nr. 2 und 5 der Promoter-Region A in Caveolin-negativen SK-ER α -Zellen bestätigt. Zusätzlich wurde der Methylierungsstatus für die Brust-Tumorzelllinie MCF-7, die keine endogene Caveolin-1-Expression aufweist, über den diagnostischen *Taq* I-Restriktionsverdau bestimmt. Das erhaltene Restriktionsmuster war identisch mit dem von SK-ER α -Zellen.

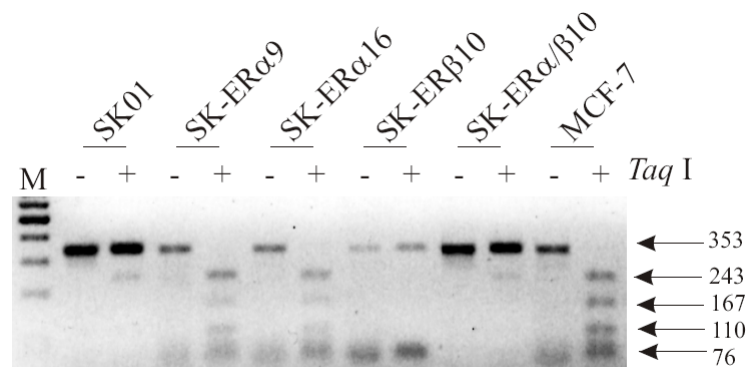


Abb. 13. *Taq* I-Restriktionsverdau zur Analyse des Methylierungsstatus der Caveolin-1-Promoter-Region

A. Bisulfit-modifizierte DNA aus SK01-, SK-ER α -, SK-ER β -, SK-ER α/β - und MCF-7-Zellen wurde in eine PCR mit den Primern CPM1-1s/1as eingesetzt; anschließend wurden die 353 bp langen PCR Produkte mit der Restriktions-Endonuklease *Taq* I verdaut. Die gesamten Restriktionsansätze (+), sowie 5 μ l unverdauten Amplifikats (-) wurden auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. M bezeichnet den Längenstandard. Bei erfolgreicher *Taq* I-Restriktion entstanden die theoretisch erwarteten 243 bp, 167 bp, 110 bp und 76 bp Fragmente.

Sowohl die Bisulfit-Sequenzierung als auch der diagnostische *Taq* I-Restriktionsverdau zeigte eine klare Korrelation zwischen Caveolin-1-Expressionsrate und Methylierungsgrad des Promoterbereichs dieses Gens. Caveolin-1-supprimierende SK-ER α Zellen wiesen eine Hypermethylierung bestimmter CpG-Dinukleotide des Caveolin-1-Promoters auf. Dagegen lagen dieselben CpG-Stellen in Caveolin-1-exprimierenden SK01-, SK-ER β - und SK-ER α/β -Zellen unmethyliert vor.

3.1.3.3 Pharmakologische Inhibition der DNMT und HDAC

Die Methylierung von Cytosinresten in Eukaryonten wird von einer Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert, welche aus drei Mitgliedern, DNMT1, DNMT3a und DNMT3b, besteht (Bestor 1988; Okano et al. 1998). DNMT1 katalysiert die Methylierung des neu-synthetisierten DNA-Strangs während der Zellreplikation und benötigt hemimethylierte DNA als Matrize. Dieses Enzym wird auch als *Maintenance*-DNMT bezeichnet, da es den Erhalt des Methylierungsmusters von einer Zellgeneration zur nächsten gewährleistet. Indessen sind DNMT3a & 3b *de novo* Methyltransferasen, welche auch die Methylierung vollständig unmethylierter DNA katalysieren. An die methylierten CpG-Dinukleotide der DNA binden verschiedene Methyl-CpG-Bindeproteine (MeCP2, MBD1-4), die meist als transkriptionelle Repressoren fungieren (Hendrich und Bird 1998). MeCP2 rekrutiert den Adapter Sin3A und spezielle Histon-Deacetylasen (HDAC) (Nan et al. 1998). Die Deacetylierung der Histone H3 und H4 bewirkt in der Regel die Kondensation des Chromatins, welches dadurch für Transkriptionsfaktoren nur noch begrenzt zugänglich ist. Treten DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung in einer konzertierten Aktion an Genpromoter-Regionen auf, kommt es oft zu einer Stilllegung der Transkription des entsprechenden Gens.

Diese epigenetischen Prozesse sind dynamisch und lassen sich exogen durch Inhibition der DNMT- sowie HDAC-Enzyme teilweise revertieren (Karpf and Jones 2002). 5-Aza-Deoxycytidin (5-AZA) ist ein Cytosin-Analogon und inhibiert nicht-kompetitiv die Methyltransferase DNMT1. Die Histon-Deacetylasen HDAC1 und HDAC2 können durch Trichostatin A (TSA) gehemmt werden. Um die Hypothese einer epigenetischen Komponente der Caveolin-Repression in SK-ER α -Zellen auch funktionell zu testen, sollte die Wirkung dieser beiden Inhibitoren auf die Caveolin-Expression in SK-ER α -Zellen untersucht werden. Zunächst wurden für die Inhibitoren die höchsten, nicht-toxischen Konzentrationen in SK-ER α -Zellen ermittelt, welche für TSA 20 ng/ml und für 5-AZA 100 μ M betragen. Die Zellen wurden für 96 Stunden mit steigenden Konzentrationen von 5-AZA (10 μ M - 100 μ M) behandelt, wobei zu Beginn der Behandlung die Zellen in niedriger Dichte (ca. 20% Konfluenz) ausplattiert wurden, um über die folgenden Replikationszyklen eine ausreichende DNA-Demethylierung zu erzielen. Die TSA-Behandlung (15 & 20 ng/ml) erfolgte dagegen lediglich über einen Zeitraum von 48 Stunden. Nach diesen Behandlungen wurde Gesamt-RNA aus SK-ER α -Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Caveolin-1/-2-spezifischen Primerpaaren amplifiziert. Da nach 25 PCR-Zyklen weder ein Caveolin-1- noch ein Caveolin-2-spezifisches Transkript nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde die PCR-Zyklenzahl auf 28 erhöht (Abb. 14).

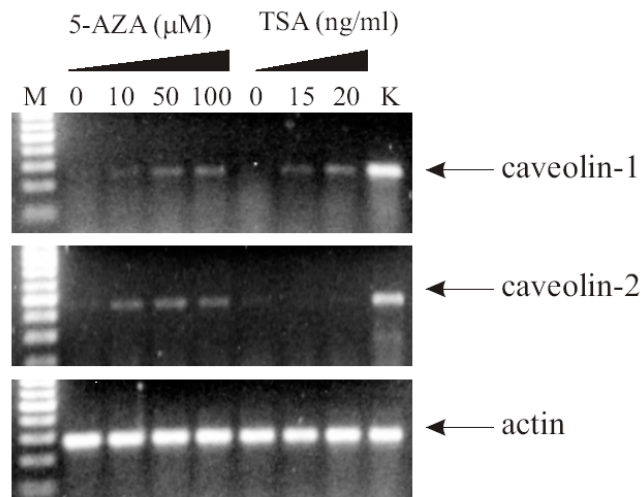


Abb. 14. RT-PCR-Analyse zur Verifizierung des Effekts von 5-AZA und TSA auf die Caveolin-Expression in SK-ER α -Zellen. SK-ER α -Zellen wurden für 96 h mit 5-AZA (0, 10 μ M - 100 μ M) oder für 48 h mit steigenden Konzentrationen von TSA (0, 15 und 20 ng/ml) behandelt. Die im Anschluss isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben, welche mit Caveolin-1/-2-spezifischen Primerpaaren in 28 PCR-Zyklen amplifiziert wurde. Je 20 μ l der PCR-Ansätze wurden auf einem 1,0% Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle für vergleichbare Konzentrationen initial eingesetzter cDNA wurde eine actin-PCR durchgeführt. Als PCR-Positivkontrolle für Caveolin-1/-2 wurde cDNA aus SK01-Zellen amplifiziert (K). M bezeichnet den Längenstandard.

Die RT-PCR-Analyse ergab, daß in unbehandelten SK-ER α -Zellen erwartungsgemäß keine Caveolin-1- oder -2-mRNA-Transkripte detektiert werden konnten. Es wurde jedoch eine partielle Reaktivierung der Caveolin-1-Transkription nach 5-AZA- und TSA-Behandlung beobachtet. Die Caveolin-2-Expression konnte nur durch 5-AZA-Behandlung teilweise wiederhergestellt werden, aber nicht durch Inhibition der HDAC mittels TSA. Die partielle Reaktivierung der Caveolin-Transkription in SK-ER α -Zellen durch DNMT-Inhibition legt einen DNA-Methylierungs-abhängigen Stilllegungsmechanismus dieser Gene nahe.

Der Erfolg der 5-AZA-Behandlung wurde auch auf DNA-Ebene überprüft. Hierfür wurde genomische DNA aus unbehandelten und 5-AZA-behandelten (100 μ M, 96 h) SK-ER α -Zellen isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Daraufhin wurde die modifizierte DNA in eine PCR mit dem Primerpaar CPM1-1s/1as eingesetzt, und das entstandene Amplifikat, welches der Caveolin-1-Promoter-Region A aus Abbildung 12 entsprach, mit *Taq* I verdaut (Abb. 15).

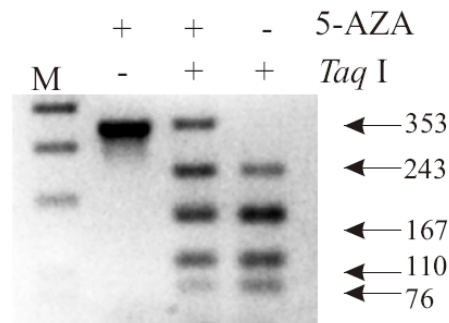


Abb. 15. Restriktion Bisulfit-modifizierter DNA mit *Taq* I nach 5-AZA-Behandlung von SK-ER α -Zellen. Nach viertägiger 5-AZA-Behandlung (100 μ M; sowie Kontrollen (-): unbehandelt) wurde genomische DNA aus SK-ER α -Zellen isoliert, Bisulfit-modifiziert, und anschließend einer PCR mit den Primern CPM1-1s/1as unterzogen. Das PCR-Produkt wurde mit *Taq* I verdaut (+) und der gesamte Restriktionsansatz auf ein 1,8% Agarosegel aufgetragen. Das resultierende Restriktionsmuster setzte sich aus 353 bp, 243 bp, 167 bp, 110 bp und 76 bp Fragmenten zusammen. M bezeichnet den Längenstandard.

Das *Taq* I-Restriktionsmuster zeigte in unbehandelten Zellen einen vollständigen Verdau des 353 bp langen PCR-Produkts in 243 bp, 167 bp, 110 bp und 76 bp Fragmente. Dagegen wiesen 5-AZA-behandelte Zellen einen hohen Anteil des nicht-restringierten 353 bp PCR-Produkts auf (Abb. 15). In diesen Zellen wurde daher eine nachweisbare Demethylierung der DNA durch Inhibition erreicht. Diese Ergebnisse belegen, daß im Zuge der Reaktivierung der Caveolin-1-Transkription durch 5-AZA Teile des Caveolin-1-Promoters demethyliert werden.

3.1.3.4 Vergleich der Expressionsstärken der DNMTs in SK-Zellklonen

Die ektopische Expression des ER α führt zu einer gesteigerten Methylierung des Caveolin-1-Promoters in SK-N-MC-Zellen. Die ER α -vermittelte *de novo* Methylierung bestimmter CpG-Dinukleotide des Promoters geht mit der Inaktivierung der Caveolin-1-Genexpression einher. In den folgenden Versuchen sollten Aufschlüsse darüber gewonnen werden, ob die Stilllegung des Caveolin-1-Gens einen zielgerichteten, durch ER α induzierten Prozess darstellt, oder ob die Überexpression des ER α zu globalen Veränderungen epigenetischer Abläufe führt und damit nur indirekt die Caveolin-Expression beeinflusst.

Prinzipiell gibt es bislang nur wenige Hinweise auf die molekularen Mechanismen, welche die *de novo* Methylierung von DNA steuern. Eine mögliche Ursache für die Entstehung aberranter Methylierungsmuster wird in einer veränderten Expressionsrate der DNA-Methyltransferasen gesucht. So wurden in Tumoren, die hypermethylierte CpG-Inseln bestimmter Gene aufweisen, erhöhte mRNA-Transkript-Konzentrationen für die drei DNMT-Subtypen gemessen (Mizuno et al. 2001; Robertson et al. 1999). Sollte die Überexpression

des ER α in SK-ER α -Zellen zu einer verstärkten Genexpression der DNMTs führen, könnte die aberrante Methylierung des Caveolin-1-Promoters eine Folge erhöhter DNMT-Aktivität sein. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich gezeigt werden, daß Fibroblasten, welche mit *c-fos* transfiziert wurden, die Expression von DNMT1 verstärken (Bakin and Curran 1999). *c-fos* wiederum ist ein Zielgen des Oestrogen-Systems und wird durch dieses positiv reguliert (Kamiya et al. 1996). Um eine eventuelle Beteiligung dieses globalen, aber eher unspezifischen Mechanismus an der Caveolin-Inaktivierung abzuklären, wurden die mRNA-Spiegel für DNMT1, DNMT3a und DNMT3b in SK01-, SK-ER α - und SK-ER β -Zellen mittels RT-PCR bestimmt. Initial wurde Gesamt-RNA von unstimulierten und Oestrogen-behandelten Zellen (10 nM, 48 h) in die cDNA-Synthese eingesetzt und anschließend mit DNMT-Subtyp-spezifischen Primerpaaren amplifiziert (Abb. 16).

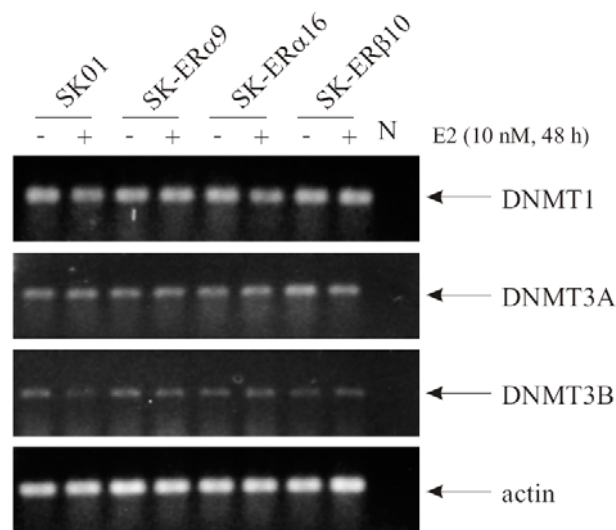


Abb. 16. RT-PCR-Analyse der Expressionsstärke von DNMT1, 3a und 3b in SK01-, SK-ER α - und SK-ER β -Zellen. Nach 48 h Oestrogen-Behandlung (10^{-8} M) oder Kontrollbehandlung (Ethanol) wurde Gesamt-RNA aus SK-Zellen isoliert und in die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die Detektion von DNMT-mRNA-Transkripten wurde die cDNA mit DNMT1-, -3a- und -3b-spezifischen Primern in 25 PCR-Zyklen amplifiziert. Je 20 μ l der PCR-Produkte wurden auf ein 1,0% Agarosegel aufgetragen. Die berechnete Länge der cDNA-Amplifikate betrug für DNMT1 232 bp, für DNMT3a 291 bp und DNMT3b 556 bp. Als Kontrolle für vergleichbare Konzentrationen initial eingesetzter cDNA diente die Amplifikation von actin-cDNA. N bezeichnet die PCR-Negativkontrolle.

Die RT-PCR-Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede in den Banden-Intensitäten, sodaß auf eine im Wesentlichen unveränderte Genexpressionsrate von DNMT1, DNMT3a und DNMT3b in SK-ER α - im Vergleich zu SK01- und SK-ER β -Zellen geschlossen werden kann. Diese Ergebnisse könnten ein erster Hinweis auf eine eher spezifische, zielgerichtete *de novo* Methylierung des Caveolin-1-Promoters in SK-ER α -Zellen sein, welche sich somit nicht allgemein mit der Hochregulation der DNMT-Expression erklären lässt.

3.1.3.5 Southern-Blot Analyse mit LINE-1 Sonden

Die Beobachtung einer erhöhten Methylierung des Caveolin-1-Promoters in SK-ER α -Zellen zog die Frage nach sich, ob dieses Phänomen parallel mit genomweiten Veränderungen des Methylierungszustands der DNA einhergeht. Als Indikator für den Methylierungsgrad genomischer DNA können unter anderem „long interspersed nuclear elements“ (LINEs) dienen. LINE-Sequenzen sind Retrotransposons und gehören zur Klasse der hochrepetitiven verstreuten DNA-Sequenzen, die reich an CpG-Dinukleotiden sind (Prak and Kazazian 2000). Die humane LINE-1-Familie besteht aus ca. 100.000 – 500.000 im humanen Genom verteilten Sequenzen, die teils trunkiert und teils in voller Länge mit 6 kb auftreten (Smit 1999). Die LINE-1-Sequenz enthält zwei offene Leseraster (ORF1 und ORF2), wobei ORF2 wahrscheinlich für eine Reverse Transkriptase kodiert (Hattori et al. 1986). LINE-1-Sequenzen liegen in ausdifferenzierten, somatischen Geweben in der Regel hypermethyliert vor (Woodcock et al. 1997). Im Verlaufe bestimmter zellulärer Veränderungen wie beispielsweise der Tumorprogression tritt häufig eine Hypomethylierung von LINE-1-Sequenzen auf (Jurgens et al. 1996). Daher werden LINE-1-Sequenzen oft zur Analyse epigenetischer Veränderungen herangezogen.

Mit Hilfe der Southern-Blot-Methode sollte der Methylierungsgrad der LINE-1-Sequenzen von SK01- und SK-ER α -Zellen verglichen werden. Genomische DNA wurde aus Oestrogen-unbehandelten Zellen isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *Hpa* II und *Msp* I im Einzelverdau geschnitten. Beide Enzyme erkennen dieselbe palindromische Sequenz (CCpGG), wobei *Hpa* II als methylierungs-sensitives Enzym nur nicht-methylierte Erkennungssequenzen schneidet, und *Msp* I unabhängig vom Methylierungszustand katalytisch aktiv ist. Die restringierte DNA wurde auf einem niederprozentigen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer LINE-1-Sonde (Santourlidis et al. 1999), die in der ORF1-Region der LINE-1-Sequenz bindet (Abb. 17).

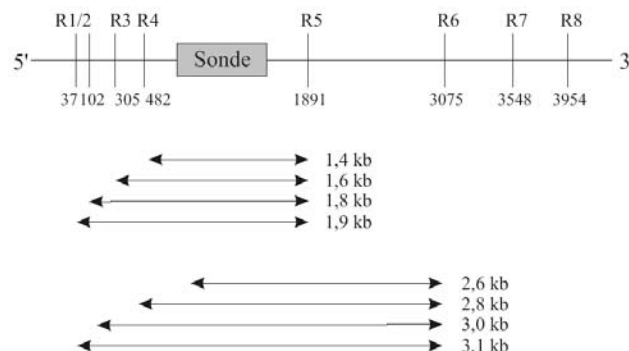


Abb. 17. *Hpa* II/*Msp* I-Restriktionskarte der 5'-Region der LINE-1-Sequenz. R bezeichnet die Erkennungssequenz CCpGG für die Restriktionsendonukleasen. Die Nukleotidpositionen für die Schnittstellen beziehen sich auf die Sequenz mit der Accession-Nummer GI339772. Das graue Rechteck stellt die Hybridisierungszielsequenz für die LINE-1-Sonde dar. Die Größe der potentiell entstehenden *Hpa* II/*Msp* I-Fragmente ist durch Pfeile angedeutet.

Die erhaltenen Hybridisierungssignale im *Msp* I-Verdau liessen sich im Wesentlichen in zwei Gruppen einteilen. Zum einen wurden niedermolekulare LINE-1-Fragmente von ca. 1,5 kb Länge, zum anderen höhermolekulare Fragmente von ca. 3 kb Länge detektiert (Abb. 17 & 18). Im *Hpa* II-Verdau zeigte die Southern-Blot-Analyse für genomische DNA aus SK01- und SK-ER α -Zellen ein ähnliches Bandenmuster. Neben einem großen Anteil unverdauter DNA, sichtbar im obersten Membranabschnitt, waren die 3,0 kb Banden vorherrschend. Die Signalintensität dieser Banden war jedoch im Vergleich zu den äquivalenten Banden hervorgehend aus der *Msp* I-Restriktion geringer. Für DNA aus SK-ER α 16-Zellen wurden im *Hpa* II-Verdau zusätzlich schwache Hybridisierungssignale der 1,5 kb Fragmente detektiert (Abb. 18).

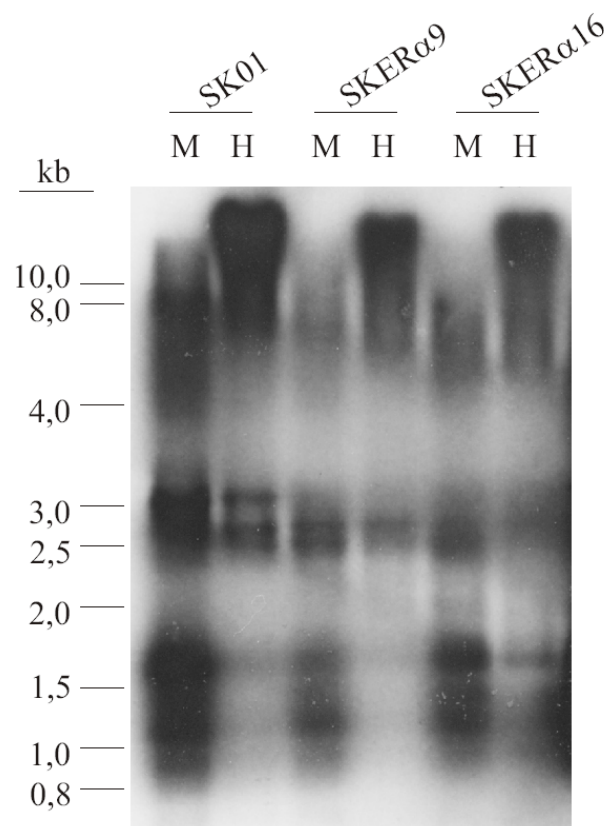


Abb. 18. Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA aus SK01 und SK-ER α Zellen mit der LINE-1 Sonde. Die Spuren waren mit je 15 μ g *Hpa* II (H)- und *Msp* I (M)-restringierter DNA aus unbehandelten SK01- und SK-ER α -Zellen beladen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv-markierten LINE-1-Sonde. Die Größe der Fragmente ist in kb angegeben.

In der Literatur ist beschrieben, daß in verschiedenen somatischen Geweben die 3,0 kb Banden im *Hpa* II-Verdau zu einem geringen Anteil auftreten, und die 1,5 kb-Fragmente in der Regel vollständig fehlen. Liegt dagegen eine stark ausgeprägte Hypomethylierung der LINE-1-Sequenzen vor, sind die Bandenintensitäten herrührend aus dem *Msp* I- und *Hpa* II-Verdau generell vergleichbar (Santourlidis et al. 1999). Dies berücksichtigend lassen die in

Abbildung 18 gezeigten Ergebnisse auf eine schwach ausgeprägte Hypomethylierung der LINE-1-Sequenzen in SK01- und SK-ER α -Zellen schließen. Aufgrund der ähnlichen *Hpa* II-Bandenmuster scheint der Grad der LINE-1-Methylierung in ER α -überexprimierenden Zellen im Vergleich zu SK01-Zellen weitgehend unverändert zu sein.

Zusammenfassend zeigen die RT-PCR-Analysen zur DNMT-Expression sowie die LINE-1-Restriktion keine Anzeichen globaler Veränderungen des Methylierungssystems in SK-ER α -Zellen, welche sich in genomweiten Veränderungen des Methylierungszustands widerspiegeln würden. Vielmehr führt die ektopische Expression des ER α zu einer scheinbar zielgerichteten Veränderung des Methylierungsmusters distinkter DNA-Abschnitte, wie für den Caveolin-1-Promoter in Abbildung 12 gezeigt wurde.

3.1.4 Reaktivierung von Caveolin-1 durch MAP-Kinase-Inhibitoren

Neben den beschriebenen epigenetischen Komponenten sollte der Einfluss von Signaltransduktionswegen auf die Caveolin-Genregulation untersucht werden. In der humanen Ovarialkarzinom-Zelllinie OAW42 konnte von Wiechen und Mitarbeitern gezeigt werden, daß neben der DNA-Methylierung auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinase) die Caveolin-1-Suppression in bestimmten Tumorzellmodellen vermitteln (Wiechen et al. 2001). Somit sollte die Bedeutung der MAP-Kinasen auch im SK-ER α -Zellmodell untersucht werden.

SK-ER α -Zellen wurden hierzu über drei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz U0126 behandelt. Dieser Wirkstoff ist ein äußerst potenter und relativ spezifischer Inhibitor von MEK1/2. Es handelt sich dabei um diejenige MAP-Kinase, die ERK1/2 phosphoryliert und aktiviert. Proteine aus U0126-behandelten und unbehandelten SK-ER α -Zellen wurden zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrads von ERK1/2 mittels Western-Blot-Analyse untersucht, um den Effekt der Inhibitor-Behandlung zu überprüfen. Für die Detektion wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet, die spezifisch phosphoryliertes ERK1/2 beziehungsweise Gesamt-ERK1/2 erkennen (Abb. 19 A).

Wie Abbildung 19A zeigt, war der Anteil phosphorylierten ERK1/2 in unbehandelten SK-ER α -Zellen am höchsten und konnte mit steigender U0126-Konzentration zunehmend unterdrückt werden. Eine RT-PCR-Analyse ausgehend von Gesamt-RNA aus den entsprechenden Zellen mit Caveolin-1/-2-Subtyp-spezifischen Primern ergab, daß die Caveolin-1-Transkription nach U0126-Behandlung schwach reaktiviert wurde (Abb. 19B). Dagegen blieb die Konzentration an Caveolin-2-Transkripten weitgehend unverändert.

Im Vergleich mit dem Ausmaß der Reaktivierung der Caveolin-1-Expression durch 5-AZA-Exposition war der MEK1/2-Inhibitor U0126 der schwächere Induktor, da erst nach 30 PCR-Zyklen Caveolin-1-spezifische PCR-Banden detektiert werden konnten.

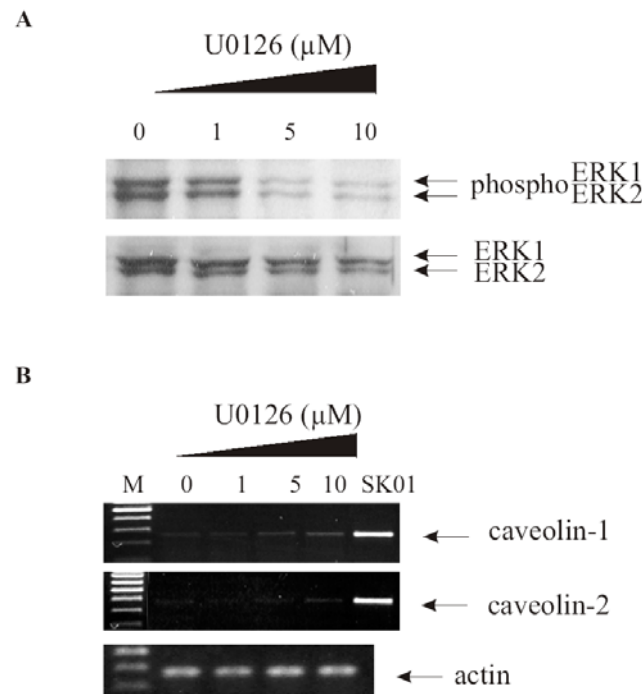


Abb. 19. Effekt des MAP-Kinase-Inhibitors U0126 auf die Caveolin-Expression in SK-ER α -Zellen. SK-ER α -Zellen wurden für 72 h mit steigenden Konzentrationen von U0126 (1, 5, 10 μ M) behandelt. Anschließend wurden Proteine sowie RNA aus den Zellen isoliert. **A.** Western-Blot-Analyse zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2. Jeweils 10 μ g Gesamtprotein wurden in einem 10% SDS-PA-Gel aufgetrennt. Die eingesetzten Primärantikörper waren spezifisch für die phosphorylierte oder unphosphorylierte Form von ERK1/2. **B.** RT-PCR-Analyse zur Detektion von Caveolin-mRNA-Transkripten. Ausgehend von cDNA behandelter und unbehandelter Zellen wurden mit Caveolin-1/-2-spezifischen Primern in 30 PCR-Zyklen spezifische PCR-Produkte generiert. 20 μ l jedes PCR-Ansatzes wurde auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Als Positivkontrolle diente cDNA aus SK01-Zellen. Die actin-PCR wurde als Kontrolle für die Quantität der eingesetzten cDNA durchgeführt. M bezeichnet den Längenstandard.

In Abbildung 20 ist die basale Aktivierung von ERK1/2 im direkten Vergleich der unterschiedlichen SK-Zellklone gezeigt. Unter Standard-Zellkulturbedingungen wurde eine schwache Phosphorylierung von ERK1/2 in SK01-, SK-ER β - und SK-ER α/β -Zellen beobachtet, die jedoch deutlich unter der von SK-ER α -Zellen lag (Abb. 20). Die erhöhte basale Aktivierung von ERK1/2 in Abwesenheit eines Stimulus in SK-ER α -Zellen könnte eine Folge der Caveolin-Suppression sein. So wurde in Fibroblasten eine Hyperaktivierung der MAP-Kinase festgestellt, wenn zuvor die Caveolin-1-Expression durch Antisense-Technik unterdrückt wurde (Galbiati et al. 1998a).

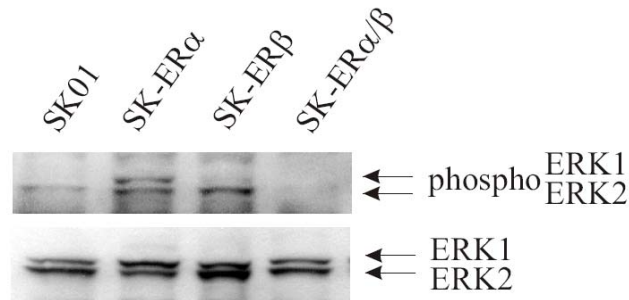


Abb. 20. Western-Blot-Analyse zur Bestimmung des basalen Phosphorylierungszustands von ERK1/2 in SK01-, SK-ER α -, SK-ER β - und SK-ER α/β -Zellen. SK-Zellen wurden für 72 h in Medium mit gestrippten Serum kultiviert. Nach Ernten der Proteine wurden 10 μ g Gesamtprotein auf einem 10% SDS-PA-Gel aufgetragen. Zur Unterscheidung der phosphorylierten und unphosphorylierten Form von ERK1/2 wurden die entsprechenden Primärantikörper eingesetzt.

3.1.5 Pränatale Oestrogen-Behandlung schwangerer Mäuse

Die inhibitorische Wirkung des ER α auf die Caveolin-1-Expression sollte in einem Tiermodell der chronischen und pränatalen Oestrogen-Behandlung überprüft werden. Oestrogen wirkt während der Entwicklung des ZNS meist als trophischer Faktor für Neurone und für neuronale Vorläufer sowohl weiblicher als auch männlicher Embryos (Beyer 1999). In dieser Entwicklungsphase finden Veränderungen im neuronalen DNA-Methylierungs- und Expressionsmuster statt (Barresi et al. 1999; Persengiev and Kilpatrick 1996). Daher wurde der Einfluß einer pränatalen siebentägigen Oestrogenbehandlung auf die Caveolin-1-Spiegel im Hypothalamus von neugeborenen Mäusen untersucht. Die Zellen des Hypothalamus exprimieren besonders hohe Mengen von ERs (Shughrue et al. 1997) und sind für modulatorische Effekte des Oestrogens stark empfänglich. Die chronische Oestrogen-Behandlung sollte die hohen ER α -Spiegel in SK-ER α -Zellen *in vitro* reflektieren.

Schwangeren C57B16/J-Mäusen wurden zwischen dem Embryonaltag 9,5-16,5 das synthetische Oestrogen-Derivat Oestradiol-Dipropionat (1 μ g/kg/d) injiziert. Vier Wochen nach der Geburt wurden männliche Neugeborene auf Ebene des Hypothalamus histologisch untersucht (Abb. 21).

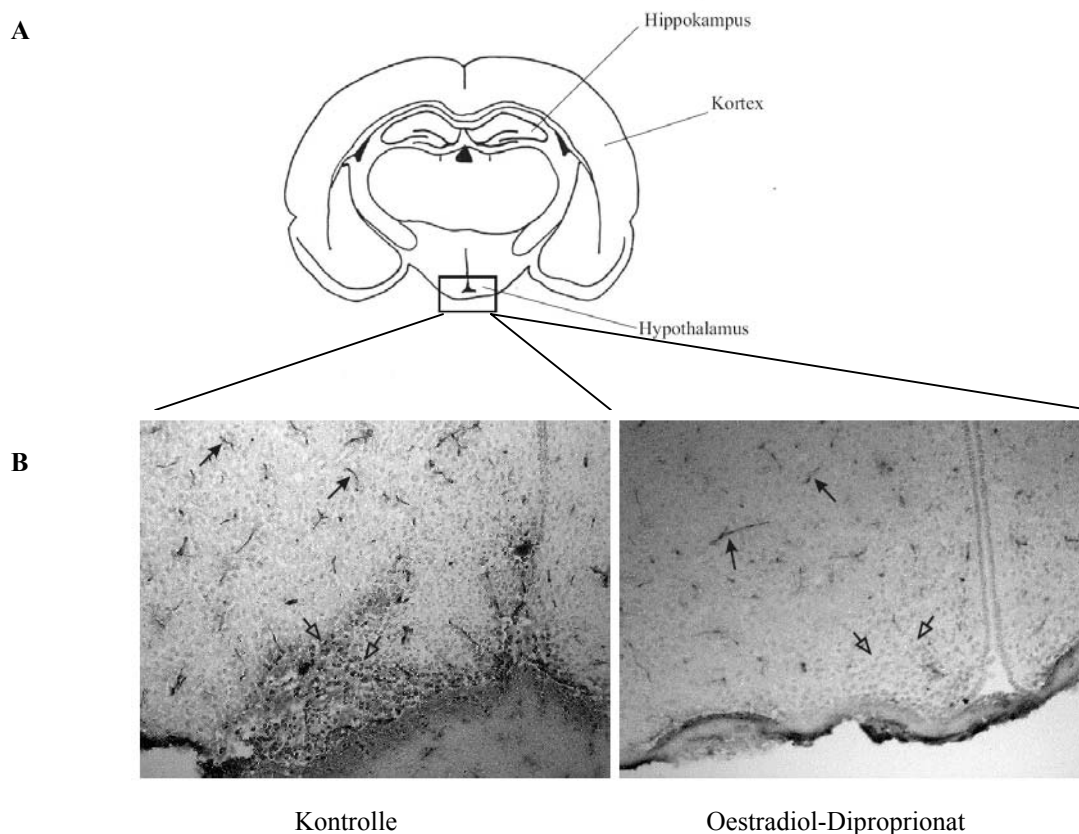


Abb. 21. Immunocytochemische Analyse des Effekts einer pränatalen Oestrogen-Langzeit-Exposition auf die Caveolin-1-Expression in der Maus. Schwangere Mäuse wurden mit 1 mg/ kg Körpergewicht Estradiol-Dipropionat für sieben Tage zwischen E9.5-E16.5 behandelt. Vier Wochen nach der Geburt wurde eine immunohistochemische Untersuchung mit Caveolin-1-Primärantikörpern durchgeführt. **A.** Gezeigt ist eine schematische Abbildung der untersuchten Hirnregion, dem Hypothalamus (Kästchen). **B.** Schnitte des Hypothalamus in der Caveolin-1-spezifischen DAB-Färbung. Ausgefüllte Pfeile weisen auf Blutgefäße, offene Pfeile auf neurale Zellen.

Die Caveolin-1-Immunfärbung des Hypothalamus un behandelter Tiere zeigte eine ausgeprägte Caveolin-1-Expression in perivaskulären Endothelzellen (Abb. 21). Daneben wurde Caveolin-1 auch in Zellen neuralen Ursprungs exprimiert. Nach der Oestrogen-Langzeit-Behandlung war die Expression von Caveolin-1 deutlich reduziert. Zum einen wurde dies an den verminderten Signal-Intensitäten sichtbar, und zum anderen an der reduzierten Anzahl Caveolin-1-positiver Zellen. Da diese Effekte vier Wochen nach Ende der Oestrogen-Behandlung gemessen wurden, kann von einer dauerhaften Reduktion der Caveolin-1-Expression ausgegangen werden. Eine Kinetik dieses regulatorischen Effekts wurde jedoch nicht durchgeführt. Aufgrund technischer Einschränkungen konnte aus der betroffenen Hirnregion keine genomische DNA gewonnen werden. Daher war eine vergleichende Analyse des Methylierungsmusters des Caveolin-1-Promoters behandelter und un behandelter Tiere nicht möglich.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse in vitro und in vivo übereinstimmend supprimierende Effekte von Oestrogen und seinen Rezeptoren auf die Caveolin-Expression. Daher erscheint ein Transfer der Daten vom SK-Zellmodell zum Tiermodell begrenzt möglich zu sein, auch wenn sich die molekularen Mechanismen der Repression in beiden Systemen möglicherweise unterscheiden. Ob im Falle der pränatalen Oestrogen-Behandlung ein epigenetischer Mechanismus beteiligt ist, muss in späteren Experimenten geklärt werden.

3.2 Regulation der Caveolin-Genexpression durch cAMP und TGF α in Astrozyten

Bereits in verschiedenen Spezies wurde eine starke gliale Expression von Caveolin-1 und Caveolin-2 auf zellulärer Ebene nachgewiesen (Ge und Pachter 2004; Ikezu et al. 1998b; Teixeira et al. 1999), insbesondere in makroglialen Zellen wie Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems (PNS) und Astrozyten des ZNS. Astrozyten repräsentieren den größten Anteil der glialen Zellpopulation im ZNS und stellen daher ein interessantes Zellmodell zur Untersuchung der Regulation der neuronalen Caveolin-Genexpression dar. Es wurde die Wirkung zwei exogener Stimuli, zyklischen AMP (cAMP) und *Transforming Growth Factor* α (TGF α), auf die astrogliale Caveolin-Expression *in vitro* analysiert. cAMP ist ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff, TGF α ein im ZNS exprimierter Wachstumsfaktor, wobei diese Moleküle in Typ I Astrozyten *in vitro* spezielle Formen der Astrozyten-Differenzierung induzieren. Caveolin-1 zeigt inhibitorische Eigenschaften auf bestimmte Komponenten sowohl cAMP-abhängiger als auch TGF α -abhängiger Signaltransduktionswege (Galbiati et al. 1998a; Razani et al. 1999). Daher sollte eine mögliche Beteiligung dieser Signaltransduktionswege für die Kontrolle der Caveolin-Genregulation näher charakterisiert werden, um Rückschlüsse auf potentielle Rückkopplungsmechanismen zu erhalten.

Die Studien wurden unter Verwendung von Astrozyten-Primärkulturen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Astrozyten-Kulturen ausgehend von verschiedenen Hirnregionen von Neugeborenen SD-Ratten des Postnataltags 1 etabliert. Nach drei Passagen *in vitro* wurden die Kulturen bei subkonfluenter Zelldichte (ca. 70% - 90%) in Serum-freies N2-haltiges MEM/F12-Medium (1:1) überführt. In diesem Stadium wurden die Experimente begonnen.

3.2.1 Repression der Caveolin-Expression durch cAMP in kortikalen Astrozyten

Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Expression der Caveolin-Subtypen 1 und 2 in kortikalen Astrozyten bestätigt (Abb. 22). Die Detektion des Strukturproteins „*glial fibrillary acidic protein*“ (GFAP) in der Immunocytochemie zeigte die astrogliale Identität dieser Zellen an. Mehr als 95% der mikroskopisch ausgewerteten Zellen waren GFAP-positiv (Abb. 22).

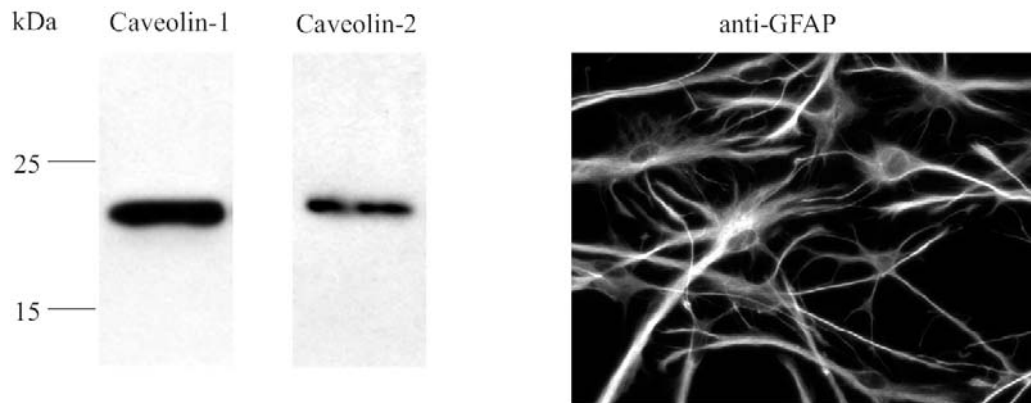


Abb. 22. Charakterisierung der astroglialen Caveolin-1/-2-Expression. **A.** Proteinlysate kortikaler Astrozyten der dritten Passage wurden auf einem 12% SDS-PA-Gel aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit Caveolin-1/-2-Subtyp-spezifischen Primärantikörpern und HRP-gekoppelten Zweitantikörpern. **B.** Kortikale Astrozyten der dritten Passage wurden fixiert, permeabilisiert und mit anti-GFAP-Primärantikörpern inkubiert. Signale der Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper wurden mit einem Zeiss Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung visualisiert.

Um die Effekte von cAMP-abhängigen intrazellulären Signalwegen auf die Caveolin-Expression zu untersuchen, wurden die Primärkulturen für 10, 24 und 72 Stunden mit Dibutyryl-cAMP (dBcAMP, 10^{-4} M) oder Forskolin (FSK, 10^{-5} M) behandelt. Da cAMP als hydrophiles Molekül nicht die Zellmembran penetriert, wurden die Kulturen mit dem synthetischen lipophilen cAMP Analog Dibutyryl-cAMP inkubiert. Forskolin ist ein starker Aktivator der Adenylat-Zyklase und bewirkt die Erhöhung des intrazellulären, endogenen cAMP-Spiegels.

Der Erfolg der Behandlung konnte sowohl morphologisch als auch biochemisch verifiziert werden. Auf morphologischer Ebene induzierte cAMP die Ausbildung langer Fortsätze am ursprünglich polygonal geformten astroglialen Zellkörper (Abb. 23). Dieser Prozess resultierte in einer sternförmigen, stellaren Morphologie der Zelle. Der stellare Phänotyp erinnert an die Morphologie von Astrozyten *in vivo*.

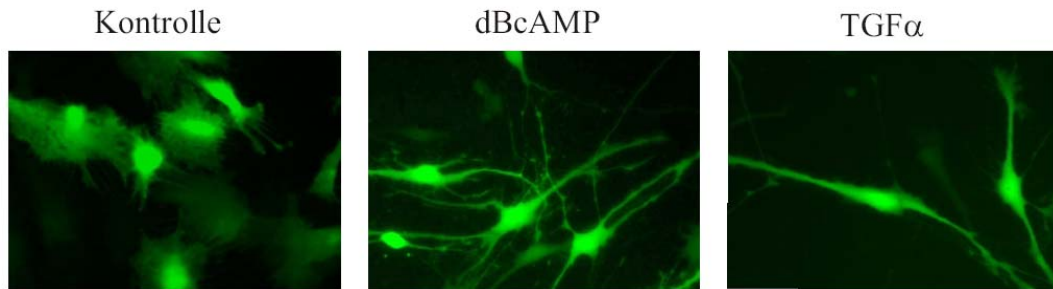


Abb. 23. Morphologische Veränderungen kortikaler Astrozyten nach cAMP- oder TGF α -Exposition. Kortikale Astrozyten wurden transient mit 5 μ g eines GFP-Expressionsvektors transfiziert und für 3 Tage mit dBcAMP (10^{-4} M) oder TGF α (50 ng/ml) behandelt. Gezeigt ist eine 40-fache Vergrößerung.

Biochemisch verursacht cAMP eine umfassende Veränderung des Expressionsprofils der Zelle. Die Expression des Glutamat-Transporters GLT-1 wird beispielsweise durch cAMP in kortikalen Astrozyten induziert (Figiel et al. 2003). GLT-1 ist für die Wieder-Aufnahme des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat aus dem extrazellulären Raum verantwortlich und ist daher indikativ für die Funktionalität von Astrozyten im ZNS (Gegelashvili and Schousboe 1998). In den folgenden Western-Blot-Analysen wurde GLT-1 daher als Kontrollprotein herangezogen.

Proteinlysate behandelter und unbehandelter Zellen wurden in eine Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der GLT-1- und Caveolin-1/-2-Proteinspiegel eingesetzt (Abb. 24). Nach 10 Stunden Behandlung mit dBcAMP oder Forskolin konnte keine Auswirkung von cAMP auf die Caveolin-Expression festgestellt werden. Im Gegensatz dazu waren die Caveolin-1/-2-Proteinspiegel nach 24- und 72-stündiger Inkubation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen deutlich reduziert. Parallel wurde wie erwartet eine drastische Hochregulation der GLT-1-Expression beobachtet (Abb. 24).

Zyklisches AMP rief also für die Astrozyten-Differenzierung charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen hervor, welche von einer Reduktion der Caveolin-1/-2-Proteinexpression begleitet waren.

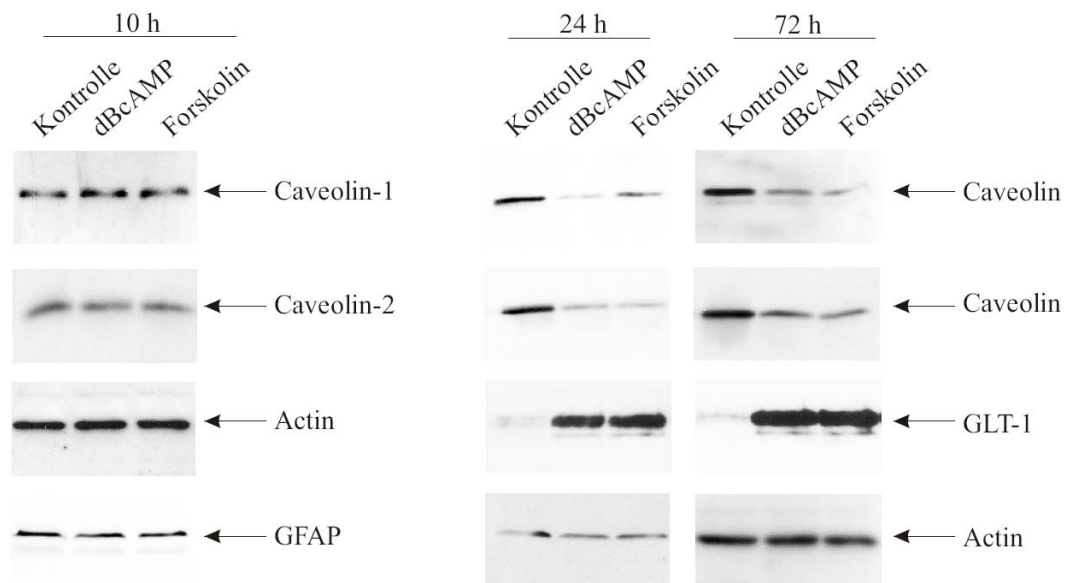


Abb. 24. Western-Blot-Analyse der Effekte von cAMP auf die Caveolin-Expression. Kortikale Astrozyten wurden über 72 h mit dBcAMP (10^{-4} M) oder Forskolin (10^{-5} M) behandelt. Jeweils 5 μ g Gesamtprotein wurden in eine Western-Blot-Analyse mit Caveolin-1/-2- und GLT-1-spezifischen Primärantikörpern eingesetzt. Als Kontrolle für gleiche Mengen aufgetragenen Proteins wurden Actin-Antikörper verwendet. Detektion von GFAP zeigte den astroglialen Zelltyp an. Kontrolle bezeichnet die unbehandelten Zellen.

3.2.2 Repression der Caveolin-Expression durch TGF α in kortikalen Astrozyten

Auch TGF α induziert eine spezielle Form der Astrozyten-Differenzierung *in vitro*. TGF α gehört zur Familie des Epidermal Growth Factors (EGF) und übt seine Funktion über die Aktivierung des EGF-Rezeptors erb B1 aus (Junier 2000). Beim EGF-Rezeptor handelt es sich um eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die nach Ligand-vermittelter Dimerisierung die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege initiiert. Im Gegensatz zu EGF wird TGF α im ZNS während aller Entwicklungsstadien abundant exprimiert (Kaser et al. 1992; Probstmeier and Schachner 1986). Astrozyten weisen generell hohe Konzentrationen von EGF-Rezeptoren auf (Wang et al. 1989). In Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades und der extrazellulären Umgebung vermittelt TGF α sowohl mitotische als auch Differenzierungsprozesse, wie sie beispielsweise bei der reaktiven Astroglieose auftreten. Zur Untersuchung des Effekts von TGF α auf die Caveolin-Expression wurden kortikale Astrozyten über einen Zeitraum von drei Tagen mit 50 ng/ml TGF α behandelt. Die TGF α -Exposition bewirkte eine Veränderung der Astrozyten-Morphologie: in Kulturen mit geringer Zelldichte induzierte TGF α die Ausbildung von astrozytären Fortsätzen, die jedoch nicht wie im Falle von cAMP strahlenförmig, sondern nur in zwei contra-lateralen Richtungen vom Zellkörper ausgingen und somit einen bipolaren Phänotyp verursachten (Abb. 23)

Die Western-Blot-Analyse zeigte, daß auch TGF α nach 72 Stunden die Expression von GLT-1 induzierte, wie bereits zuvor von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Figiel et al. 2003). Andererseits bewirkte TGF α eine Reduktion der Caveolin-1/-2-Proteinspiegel in kortikalen Astrozyten von vergleichbarem Ausmaß wie bei Forskolin-behandelten Zellen (Abb. 25).

Damit wurden zwei Moleküle, cAMP und TGF α , identifiziert, welche in kortikalen Astrozyten die Caveolin-Protein-Expression im Verlaufe der Zell-Differenzierung negativ beeinflussen.

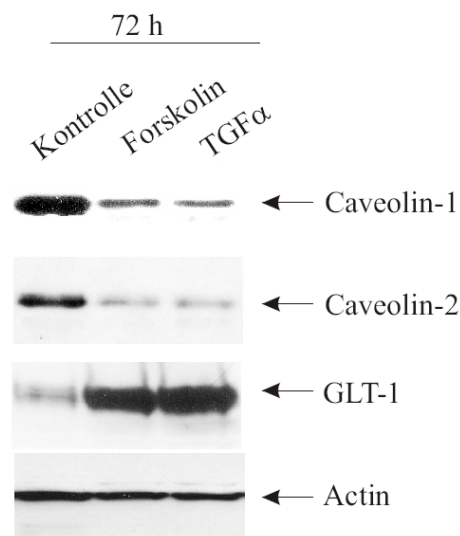


Abb. 25. Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Effekte von TGF α auf die Caveolin-Expression. Kortikale Astrozyten wurden entweder mit Forskolin (10^{-5} M) oder TGF α (50 ng/ml) für 72 h inkubiert. Nach Proteinextraktion wurden je 5 μ g Gesamtprotein einer Western-Blot-Analyse mit Caveolin-1/-2-, GLT-1- und Actin-spezifischen Antikörpern unterzogen. Kontrolle bezeichnet die unbehandelten Zellen.

3.2.3 Effekte von cAMP und TGF α auf die Caveolin-Transkription

Die beobachtete Reduktion der Caveolin-Proteinspiegel könnte entweder durch eine beschleunigte Degradation der Proteine verursacht werden oder die Folge einer herunterregulierten Transkriptionsrate der entsprechenden Gene sein. In den meisten Fällen wird die Menge der Caveoline bereits auf Transkriptionsebene reguliert. Aus diesem Grund wurden die Effekte von cAMP und TGF α auf die mRNA-Syntheserate mittels semi-quantitativer RT-PCR und Real-Time-PCR untersucht.

Kortikale Astrozyten wurden für 72 Stunden in An- oder Abwesenheit von Forskolin (10^{-5} M) oder TGF α (50 ng/ml) inkubiert, um anschließend Gesamt-RNA aus den Zellen zu gewinnen.

Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde diese mit Caveolin-1- und Caveolin-2-spezifischen Primerpaaren in 25 PCR-Zyklen amplifiziert (Abb. 26). Es zeigte sich, daß sowohl Forskolin- als auch $TGF\alpha$ eine verminderte Transkription von Caveolin-1 und Caveolin-2 verursachte (Abb. 26 A). Die quantitative Auswertung der Banden-Intensitäten ergab eine Reduktion von ca. 80% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abb. 26 B).

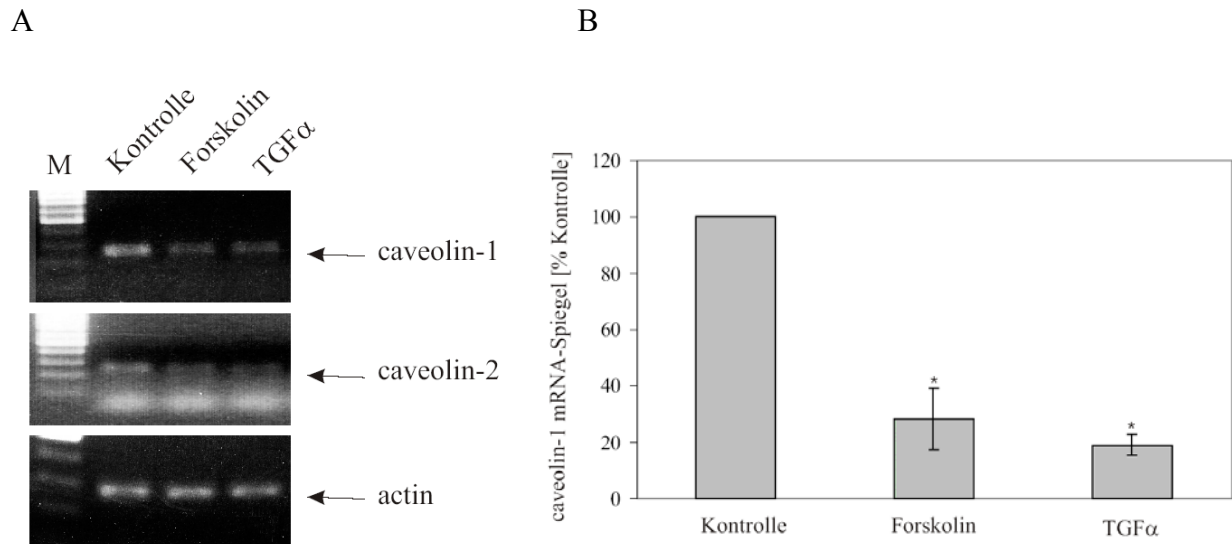


Abb. 26. RT-PCR-Analyse der Effekte von cAMP und $TGF\alpha$ auf die Caveolin-Transkription. Vor Isolierung der Gesamt-RNA wurden kortikale Astrozyten 72 h Forskolin (10^{-5} M) oder $TGF\alpha$ (50 ng/ml) exponiert. Die Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben, welche in eine PCR mit Caveolin-1/-2-spezifischen Primern eingesetzt wurde. Amplifikation der actin-cDNA diente der Überprüfung gleicher Mengen initial eingesetzter RNA/cDNA. **A.** Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die berechnete Länge der PCR-Produkte betrug für caveolin-1 254 bp, und für caveolin-2 sowie actin 275 bp. Kontrolle bezeichnet die unbehandelten Zellen. M bezeichnet den Längenstandard. **B.** Die optischen Dichten der in A. erhaltenen Caveolin-1-spezifischen Banden wurden quantifiziert und zu den Intensitäten der Actin-spezifischen Banden normalisiert. Das Caveolin-1-Amplifikat der unbehandelten Astrozyten wurde auf 100% gesetzt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, wobei * $p < 0,05$ $TGF\alpha$, Forskolin versus Kontrolle bedeutet.

Diese Ergebnisse sollten für Caveolin-1 mittels Real-Time-PCR-Analyse genauer quantifiziert werden. Die Real-Time-PCR erlaubt die Ermittlung relativer Expressionsänderungen eines bestimmten Zielgens nach Abgleich mit der Expression eines Haushaltsgens (z.B. Actin). Das Prinzip der Real-Time-PCR-Analyse basiert auf der Zugabe eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs (Sybr-Green) zum PCR-Mastermix, der während des Ablaufs der PCR in die neusynthetisierten DNA-Doppelstränge interkaliert und nur in dieser Form Licht bestimmter Wellenlänge emittiert. Folglich steigt das Fluoreszenzsignal nach Überwindung einer sogenannten Lag-Phase exponentiell an. Das Fluoreszenz-Signal wird über den gesamten Verlauf der PCR mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgezeichnet und

verrechnet. Maß für die Ausgangskonzentration der initial eingesetzten cDNA ist derjenige PCR-Zyklus, nach dessen Ablauf die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht. Dieser Zyklus wird auch als Threshold Cycle (C_T -Wert) bezeichnet. Rechnerisch tritt die Amplifikation 10-fach höher konzentrierter cDNA um ca. 3 C_T -Werte eher in die exponentielle Phase ein. In Abbildung 27 sind die Amplifikationskurven für cDNA aus cAMP- oder $TGF\alpha$ -behandelten kortikalen Astrozyten und unbehandelten Zellen gezeigt. Die Amplifikationsgrenzwerte (C_T) verschoben sich von $C_T \sim 17,4$ für die Kontrollen auf $C_T \sim 19,5$ für die $TGF\alpha$ -Behandlung und $C_T \sim 20,3$ für die Forskolin-Behandlung (Abb. 27). Nach Abgleich mit den jeweiligen C_T -Werten der Actin-Amplifikationskurve wurde eine Reduktion der Caveolin-1-cDNA Konzentration um etwa 75% nach pharmakologischer Exposition erhalten (detaillierte Formel siehe Material und Methoden).

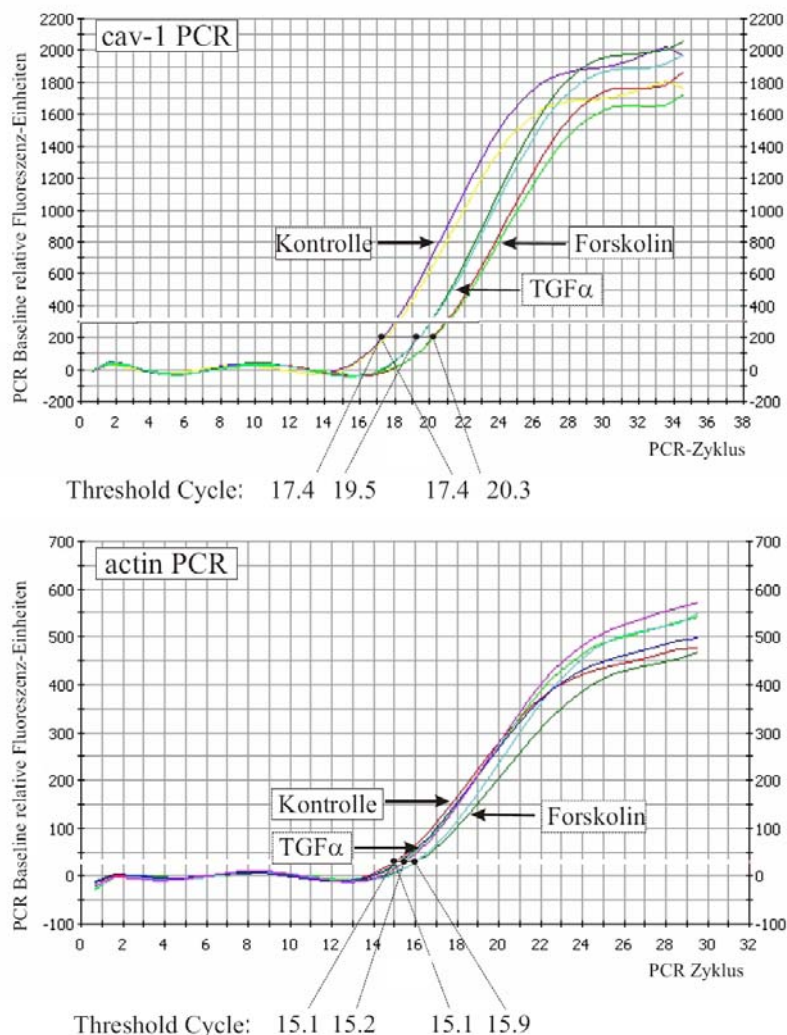


Abb. 27. Real-Time-PCR-Analyse zur Quantifizierung der Caveolin-1-Transkriptionsänderung nach Forskolin- und $TGF\alpha$ -Behandlung. Die Real-Time-PCR wurde unter Verwendung der cDNA-Proben sowie der Caveolin-1- und actin-spezifischen Primer aus Abb. 26 in jeweils doppelten Ansätzen durchgeführt. Gezeigt sind die Amplifikationskurven für caveolin-1 (oben) und actin (unten) mit den entsprechenden vom Computer ermittelten C_T -Werten.

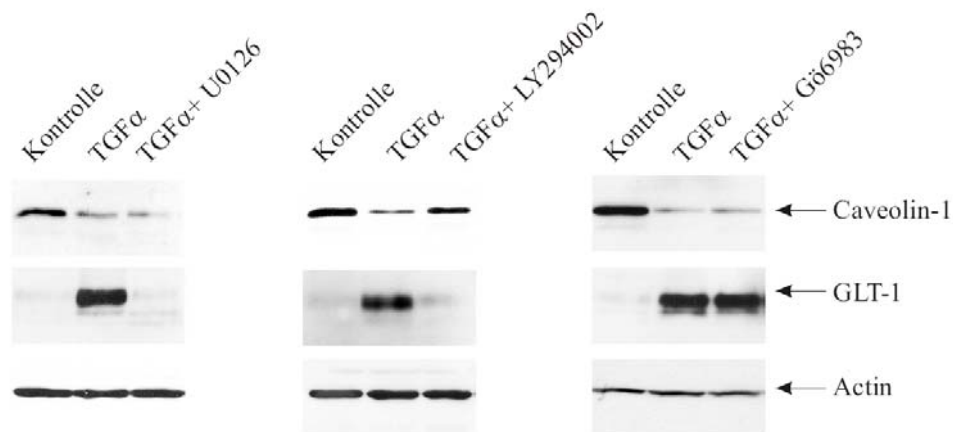
Sowohl cAMP als auch TGF α bewirken somit eine deutlich transkriptionelle Reduzierung der Caveolin-1/-2-Expression. Die verminderten Caveolin-Protein-Konzentrationen könnten sich daher in der herabgesetzten Transkription widerspiegeln.

3.2.4 Signaltransduktionswege bei der TGF α -vermittelten Caveolin-Suppression

Nachdem TGF α die Aktivität zahlreicher verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionswege moduliert, sollte der molekulare Mechanismus der TGF α -vermittelten Suppression der Caveolin-Genexpression näher untersucht werden. Die Dimerisierung des EGF-Rezeptors nach Ligandbindung induziert die Aktivierung der MAP-Kinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und PLC γ -abhängigen-Proteinkinase C (PKC) (Moghal and Sternberg 1999; Mueller et al. 1997). Durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren der erwähnten Kinasen (MAP-, PI3-Kinase, und PKC), sollte der Einfluss des jeweiligen Signalweges auf die Caveolin-1-Expression untersucht werden. U0126 ist ein potenter Inhibitor von MEK1/2 und wurde in einer Endkonzentration von 10 μ M eingesetzt. LY294002 hemmt die PI3-Kinase in einer Endkonzentration von 10 μ M und Gö6983 die PKC in einer Endkonzentration von 1 μ M. Die Primärkulturen kortikaler Astrozyten wurden für drei Tage mit den jeweiligen Inhibitoren und TGF α (50 ng/ml) co-behandelt.

Abbildung 28 zeigt, daß LY294002 als Inhibitor der PI3-Kinase die TGF α -vermittelte Hochregulation der GLT-1-Expression vollständig blockierte (Figiel et al. 2003). Dieser Inhibitor schwächte ebenfalls die supprimierende Wirkung von TGF α auf die Caveolin-1-Expression ab, welche partiell revertiert wurde. Des Weiteren hob auch U0126 als Inhibitor der MEK1/2 die TGF α -induzierte Induktion von GLT-1 auf, zeigte dagegen aber keinen Effekt auf die Caveolin-1-Repression. Die Inhibition der PKC durch Gö6983 konnte bei simultaner TGF α -Behandlung weder die Induktion von GLT-1, noch die Suppression von Caveolin-1 verhindern. Der PI3-Kinase Signalweg erscheint somit zumindest teilweise für die inhibitorische Wirkung von TGF α auf die Caveolin-1-Expression verantwortlich. Interessanterweise wird auch die Regulation der GLT-1-Expression durch diesen Signalweg kontrolliert.

A



B

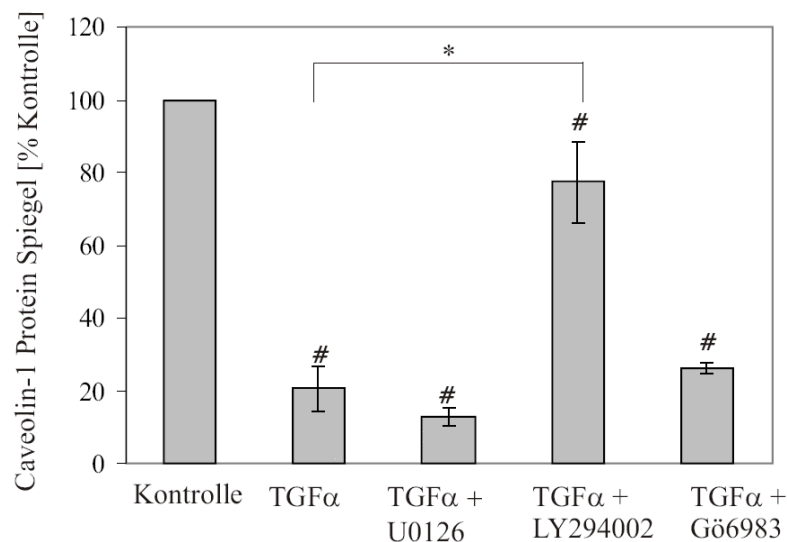


Abb. 28. Western-Blot-Analyse der Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege bei der TGF α -vermittelten Caveolin-1-Suppression. Kortikale Astrozyten wurden für 72 h mit TGF α (50 ng/ml) in Kombination mit U0126 (10 μ M), LY294002 (10 μ M) oder Gö6983 (1 μ M) behandelt. **A.** Jeweils 5 μ g Gesamtein wurden einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung Caveolin-1-, GLT-1- sowie Actin-spezifischer Antikörper unterzogen. **B.** Die optischen Dichten der in A. erhaltenen Caveolin-1-spezifischen Banden wurden quantifiziert und auf die Intensitäten der Actin-spezifischen Banden normalisiert. Der Caveolin-1-Spiegel der unbehandelten Astrozyten wurde als 100% gesetzt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, wobei (#) $p < 0,05$ Kontrolle versus behandelte Zellen und (*) $p < 0,05$ TGF α versus TGF α + LY294002 bedeutet.

3.2.5 Einfluß der Histon-Modifikation auf die Caveolin-1-Suppression

Chromatin-Modifikationsprozesse wie die Histon-Deacetylierung beeinflussen die Caveolin-1-Transkription in negativer Weise, wie im Falle der ER α -vermittelten Caveolin-1-Suppression (Abb. 14) gezeigt wurde. Daher wurde eine potentielle Beteiligung dieses Mechanismus auch für den TGF α -vermittelten Effekt untersucht. Hierzu wurden kortikale

Astrozyten für 72 Stunden kombiniert mit TGF α (50 ng/ml) und Trichostatin A (TSA), einem Inhibitor der Histon-Deacetylasen, behandelt. Primäre Astrozyten wiesen eine wesentlich höhere Toleranz gegenüber TSA im Vergleich zu SK-N-MC-Zellen auf, weshalb auch Konzentrationen von 500 ng/ml TSA toleriert wurden.

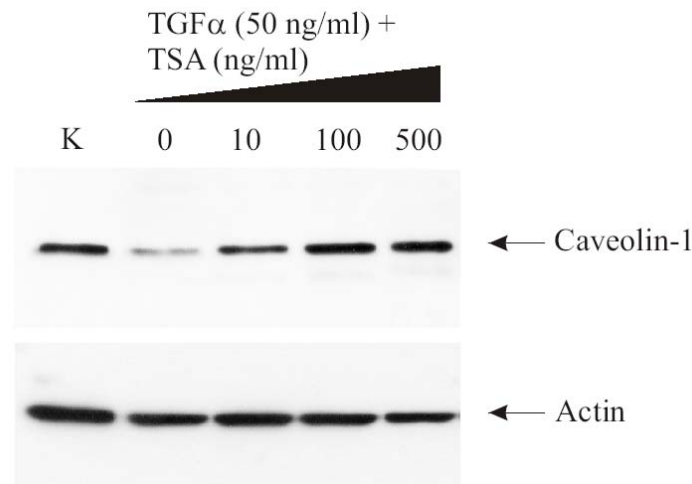


Abb. 29. Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von TSA auf die TGF α -vermittelte Caveolin-1-Suppression. Je 5 μ g Proteinextrakt von TGF α -behandelten (50 ng/ml) und TSA-co-behandelten (0, 10 –500 ng/ml) kortikalen Astrozyten wurden in eine Western-Blot-Analyse mit Caveolin-1- sowie Actin-spezifischen Antikörpern eingesetzt. K bezeichnet die unbehandelten Kontrollzellen.

Wie in Abbildung 29 gezeigt, blockierte TSA in steigender Konzentration zunehmend die inhibitorischen Effekte von TGF α auf die Caveolin-1-Expression. Zusätzlich wurde die Wirkung von TSA auf die Caveolin-1-Expression in Abwesenheit von TGF α untersucht, erbrachte aber keine Unterschiede im Expressionsniveau im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Auch induzierte TSA nicht die Expression von GLUT-1 (Daten nicht gezeigt).

Obwohl die TSA-Behandlung ein weithin akzeptiertes Modell zur Untersuchung von epigenetischen Genregulationsmechanismen darstellt, muß man bei der Interpretation dieser Daten Vorsicht walten lassen. Durch die Inhibition der Histon-Deacetylasen werden eine Reihe von Genen reaktiviert, die möglicherweise ihrerseits als Aktivatoren für die Caveolin-1-Expression fungieren. Somit kann bei der TGF α -vermittelten Caveolin-1-Suppression zwar nicht notwendigerweise auf die Beteiligung einer Histon-Deacetylierung geschlossen werden, zumindest gibt es dafür jedoch einen starken Anhaltspunkt.

3.2.6 Hirnregion-spezifische Unterschiede in der Regulation der Caveolin-Expression

Die Expression von GLT-1 wird bekanntermaßen nur in Astrozyten von Kortex und Striatum induziert, dagegen zeigen Astrozyten des Kleinhirns und Mittelhirns nach Applikation von cAMP oder TGF α keine Hochregulation der GLT-1-Expression (Schluter et al. 2002). Wie in Abbildung 28 gezeigt, wurde die Caveolin-Expression durch cAMP und TGF α in kortikalen Astrozyten negativ reguliert, wobei die Regulation teilweise über den PI3-Kinase-Signalweg erfolgte, welcher auch an der Induktion der GLT-1-Expression beteiligt ist. Daher sollte untersucht werden, ob die für die GLT-1-Induktion beschriebene Hirnregionspezifität auch für die Regulierbarkeit der Caveolin-Expression relevant ist.

Es wurden Astrozyten-Kulturen aus dem Striatum, Kleinhirn und Mittelhirn (ca. 14 DIV) angelegt und für 72 Stunden mit dBcAMP (10^{-4} M), Forskolin (10^{-5} M) oder TGF α (50 ng/ml) behandelt. Die Proteinextrakte der Kulturen wurden einer Western-Blot-Analyse mit Caveolin-1/-2- und GLT-1-spezifischen Antikörpern unterzogen (Abb. 30).

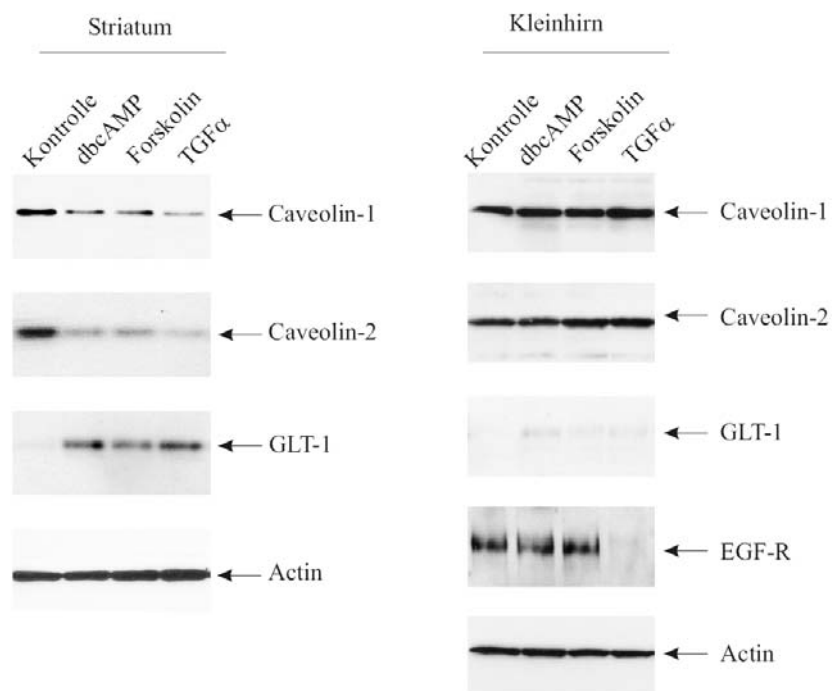


Abb. 30. Western-Blot-Analyse zur Untersuchung Hirnregion-spezifischer Unterschiede in der Caveolin-Regulierbarkeit durch cAMP und TGF α . Astrozyten aus Striatum und Kleinhirn von SD-Ratten (P1) wurden für 72 h mit dBcAMP (10^{-4} M), Forskolin (10^{-5} M) oder TGF α (50 ng/ml) behandelt. Proteinextrakte (5 μ g) wurden im Anschluß in eine Western-Blot-Analyse mit Caveolin-1/-2-, GLT-1-, EGF-Rezeptor- sowie Actin-spezifischen Antikörpern eingesetzt.

Die in Abbildung 30 gezeigten Banden-Intensitäten ergaben, daß striatale Astrozyten reduzierte Caveolin-1/-2-Proteinspiegel nach Behandlung mit den genannten Stimuli aufwiesen. Im Gegensatz dazu wurde keine Regulation der Caveolin-1/-2-Expression in Astrozyten aus Klein- und Mittelhirn (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Eine mögliche Ursache für die fehlende Regulierbarkeit der Caveoline in diesen Hirnregionen könnte die Abwesenheit funktioneller EGF-Rezeptoren sein. Daher wurde der EGF-Rezeptor-Status mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung EGF-Rezeptor-spezifischer Antikörper überprüft. Es zeigte sich, daß Astrozyten beider Hirnregionen den EGF-Rezeptor exprimieren und sich die Rezeptor-Konzentrationen nach $TGF\alpha$ -Applikation in einer negativen Rückkopplungsregulation reduzieren. Dieses Ergebnis belegt die Präsenz funktioneller EGF-Rezeptoren in Astrozyten von Striatum und Kleinhirn. Parallel wurde wie erwartet die Induktion der GLT-1-Expression nur in astroglialen Zellen des Striatums beobachtet. Folglich lässt sich die Beobachtung einer reziproken Caveolin- und GLT-1-Expression auf weitere Hirnregionen ausweiten und legt die Vermutung nahe, daß gemeinsame Signalwege, durch welche die reziproke Regulation vermittelt wird, in diesen Hirnregionen aktiv sind. Eventuell liegt die Hirnregion-Spezifität dieser Regulation auch in der An- oder Abwesenheit co-regulatorischer Faktoren begründet, welche die Expression der analysierten Zielmoleküle Caveolin und GLT-1 mit beeinflussen.

3.3 Bestimmung der GLT-1-Lokalisation in Lipid Rafts

Der astrogliale Glutamat-Transporter GLT-1 erfüllt die wichtige Aufgabe, extrazelluläres Glutamat, welches als Folge exzitatorischer neuronaler Aktivität in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wurde, über einen Na^+ -gekoppelten Symport-Mechanismus in die astrogliale Zelle zu transportieren. Somit gewährleistet GLT-1 den Erhalt der extrazellulären Glutamat-Konzentration auf einem subtoxischen Niveau. Die Aktivität von GLT-1 kann beispielsweise über die Expressionsstärke des GLT-1-Gens reguliert werden. Dieser Mechanismus wurde im vorherigen Abschnitt anhand der Aktivierung cAMP- und $TGF\alpha$ -abhängiger Signaltransduktionswege demonstriert. Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, daß der GLT-1-vermittelte Glutamat-Transport von der Anwesenheit membranären Cholesterols abhängig ist (Butchbach et al. 2004). Wird durch die Applikation des Oligosaccharids Methyl- β -Cyclodextrin selektiv Cholesterol aus der Plasmamembran extrahiert, findet der Glutamat-Transport nur noch stark eingeschränkt statt. Diese Ergebnisse deuten auf eine Lokalisation von GLT-1 in Cholesterol-reichen Membransubdomänen hin. Nachdem bereits die in Abbildung 30 gezeigte enge Korrelation zwischen Caveolin-1-Repression und GLT-1-Induktion in kortikalen Astrozyten nachgewiesen wurde, sollte im

nächsten Schritt die subzelluläre Lokalisation von GLT-1 im Verhältnis zu Caveolin ermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurden mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation eine Lipid Raft-Präparation aus kortikalen Astrozyten durchgeführt. Die Astrozyten wurden zuvor für drei Tage mit Forskolin (10^{-5} M) oder TGF α (50 ng/ml) behandelt, um in der anschließenden Western-Blot-Analyse nachweisbare Konzentrationen von GLT-1 detektieren zu können. Der Aufschluß der Zellen erfolgte unter Detergenz-freien Bedingungen durch Homogenisierung und Sonifizierung, bevor die isolierten Zellextrakte auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (5%, 30%, 40%) geladen wurden. Nach einer zweistündigen Zentrifugation bei 100.000 g wurden acht Fraktionen beginnend von der Spitze bis zum Boden des Gradienten abgenommen. Die zweite Fraktion beinhaltet dabei den Übergang zwischen 5% und 30% Saccharose-Lösung und repräsentierte die Lipid Raft-Fraktion. Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden direkt in die Western-Blot-Analyse zum Nachweis von Caveolin-1 und GLT-1 eingesetzt (Abb. 31).

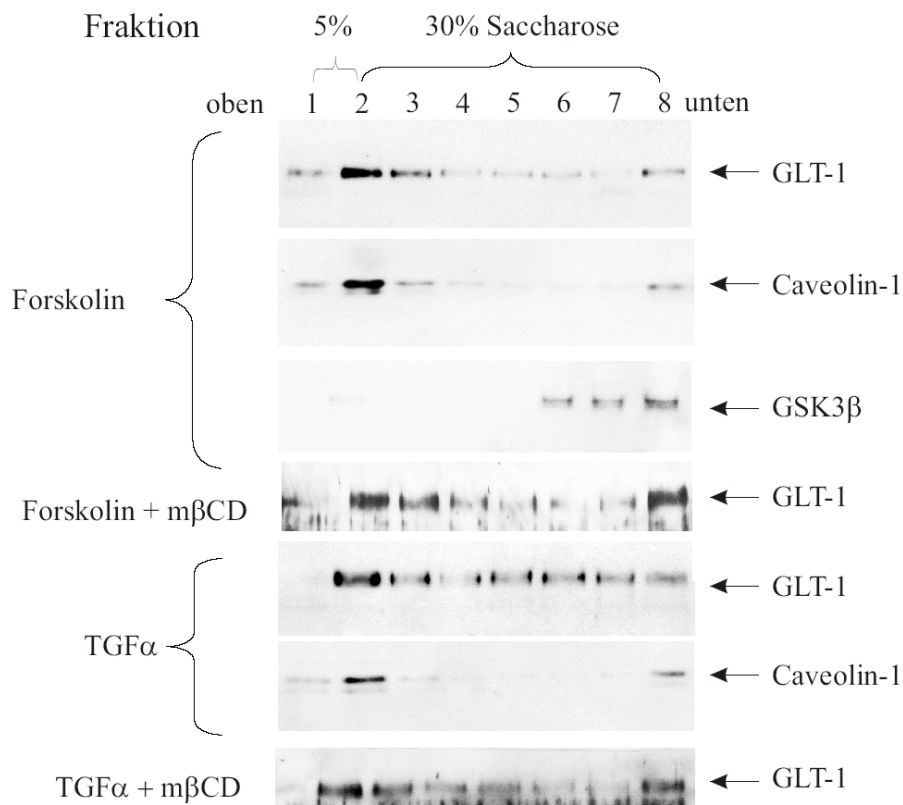


Abb. 31. Kofraktionierung von Caveolin-1 und GLT-1 mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation. Forskolin- (10^{-5} M, 72 h) und TGF α - (50 ng/ml, 72 h) behandelte kortikale Astrozyten wurden homogenisiert und in einem diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten fraktioniert. Methyl- β -Cyclodextrin wurde 30 min vor Raft-Isolation zu den Zellen gegeben. Die Fraktionen wurden ausgehend von der Spitze des Gradienten bis zum Boden abgenommen und direkt in die Western-Blot-Analyse eingesetzt. Für die Immunodetektion wurden Caveolin-1- und GLT-1-spezifische Antikörper verwendet. Die Detektion von GSK3 β in Fraktionen höherer Dichte zeigte eine kontaminationsfreie Raft-Fraktion (zweite Fraktion) an.

Wie in Abbildung 31 gezeigt, konnten die höchsten Signale für Caveolin-1 in der zweiten, Raft-angereicherten Fraktion detektiert werden. Das Ergebnis der GLT-1 Western-Blot-Analyse demonstrierte, daß auch GLT-1 in der zweiten Fraktion von cAMP- oder TGF α -behandelten Astrozyten konzentriert vorlag. GSK3 β diene als Kontrollprotein, welches bekanntermaßen nicht in Rafts lokalisiert ist (Galbiati et al. 2000). Erwartungsgemäß wurde eine Lokalisierung von GSK3 β in den Nicht-Raft-Fraktionen 6-8 beobachtet.

Wurden die Zellen jedoch vor Durchführung der Detergenz-freien Zellextraktion zusätzlich für 30 Minuten mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin (m β CD) inkubiert, ergab sich eine Verschiebung des GLT-1-Signals von der zweiten in die achte Fraktion (Abb. 31). Zu erklären wäre dieses Phänomen durch den m β CD-verursachten Cholesterol-Entzug aus der Zellmembran, der im Allgemeinen eine Zerstörung der Raft/ Caveolae-Strukturen bewirkt (Parpal et al. 2001). Damit kommt es zu einer Umverteilung der Population der GLT-1-Moleküle in der Zellmembran. Caveolin-1 konnte nach m β CD-Inkubation in keiner der Fraktionen mehr nachgewiesen werden.

Dieses biochemische Nachweisverfahren zur Assoziation von GLT-1 mit Cholesterol-angereicherten Raft-Domänen lässt noch keine Aussage über die exakte Lokalisation des Glutamat-Transporters in Rafts oder Caveolae zu. Aus diesem Grund wurde zur Bestimmung der membranären Feinverteilung von GLT-1 eine Ko-Immunolokalisationsstudie mit Caveolin-1 durchgeführt.

Kortikale Astrozyten wurden hierzu für 72 Stunden mit dBcAMP (10^{-4} M) oder TGF α (50 ng/ml) inkubiert, anschließend fixiert, permeabilisiert und mit einer Kombination aus GLT-1- und Caveolin-1-spezifischen Erstantikörpern sowie Cy-gekoppelten Sekundärantikörpern behandelt. Trotz der in der Western-Blot-Analyse sichtbaren Reduzierung der Caveolin-1-Spiegel nach dBcAMP- oder TGF α -Behandlung konnte in der immunozytochemischen Färbung die für Caveolin-1 charakteristische subzelluläre Verteilung beobachtet werden (Abb. 32). Die Caveolin-1-Immunoreaktivität wurde sowohl im Zytoplasma als auch an der Zelloberfläche als prominente, fluoreszierende Punkte detektiert. Zusätzlich wurde Caveolin-1 entlang der astrozytären Fortsätze gefunden. Die Doppel-Immunfluoreszenz mit Caveolin-1- und GLT-1-spezifischen Erstantikörpern ergab eine nur äußerst geringe Ko-Lokalisation. Dagegen konnte in einem Kontrollexperiment Caveolin-1 und Caveolin-2 eindeutig kolo-kalisiert werden, zu erkennen an dem hohen Anteil der gelben Mischfarbe nach Überlagerung der Cy2- und Cy3-Fluoreszenz-Kanäle (Abb. 32)

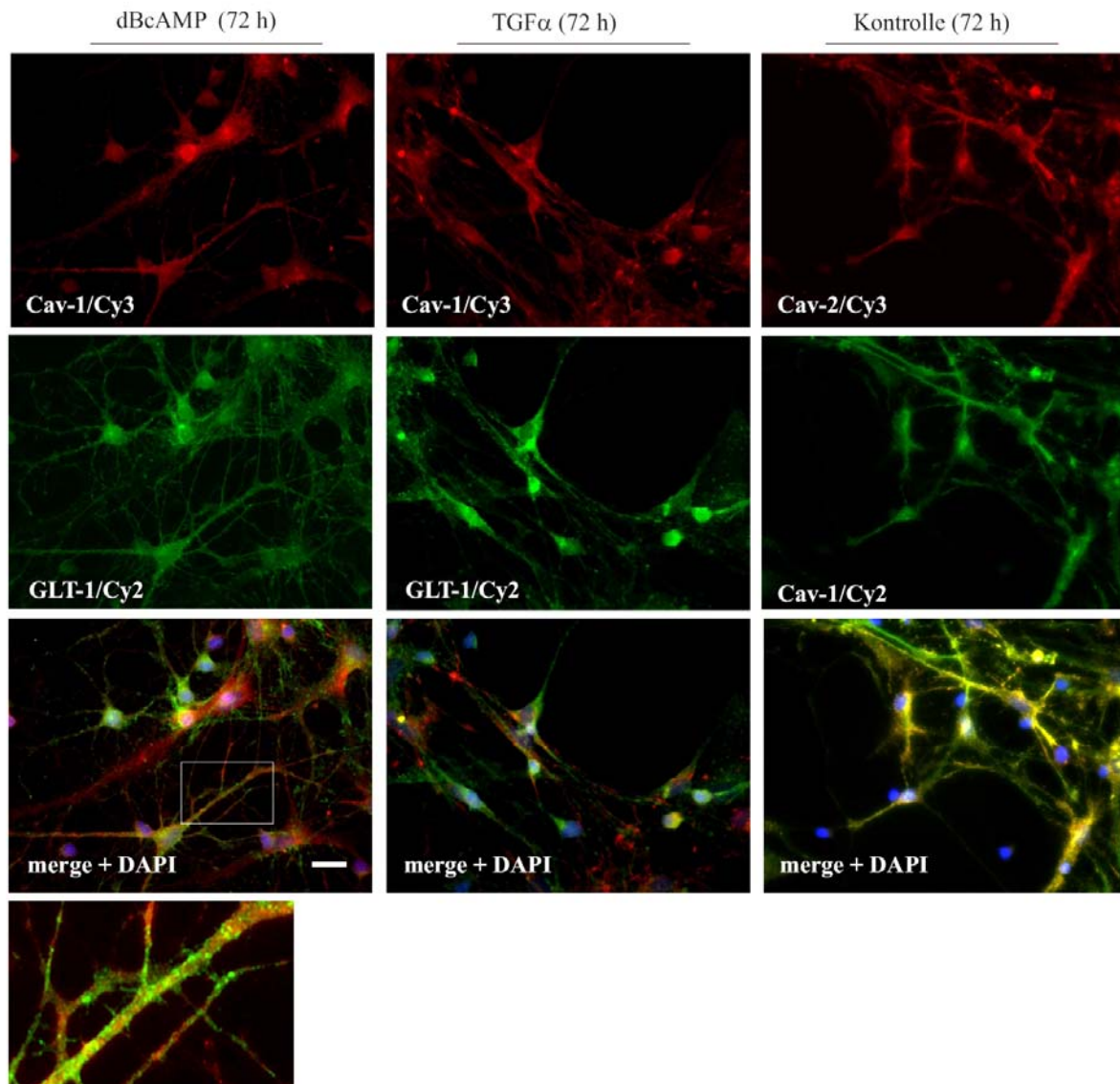


Abb. 32. Immunfluoreszenz-Färbung von Caveolin-1 und GLT-1 in Astrozyten. Kortikale Astrozyten wurden für 72 h mit 10^{-4} M dBcAMP (linke Spalte) oder 50 ng/ml TGF α (mittlere Spalte) behandelt, anschließend fixiert, permeabilisiert und mit Caveolin-1- und GLT-1-spezifischen Primärantikörpern inkubiert. Die Detektion der Cy2- sowie Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte an einem Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop. DAPI-Färbung im Merge visualisierte die Zellkerne. Merge bezeichnet die Überlagerung der Cy2- und Cy3-Fluoreszenz-Signale. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt einen astrozytären Fortsatz der dBcAMP-behandelten Zellen. Als Positivkontrolle für die Ko-Lokalisierung wurde eine Doppel-Immunfärbung für Caveolin-1 und Caveolin-2 in unbehandelten Astrozyten durchgeführt. Der Skalenbalken entspricht 10 μ m.

Diese Ergebnisse zeigen, daß GLT-1 in Lipid Rafts von Astrozyten lokalisiert ist, welche sich allerdings von Caveolae unterscheiden. Offenbar wird im Verlaufe der funktionellen Astrozyten-Differenzierung die Caveolin-Expression herunterreguliert und damit möglicherweise die Anzahl von Caveolae reduziert. Andererseits wird die GLT-1-Expression induziert, welches letztlich in nicht-caveolären Lipid Rafts akkumuliert und dort den Import von Glutamat katalysiert.

Ob sich diese Beobachtung einer pharmakologisch-induzierten Astrozyten-Differenzierung und der damit einhergehenden Caveolin-Suppression auf die Astrozyten-Differenzierung in vivo ausweiten läßt, müssen zukünftige Studien zeigen.

4 Diskussion

Die Auswirkungen einer veränderten Caveolin-Genexpression auf die Zelle sind aufgrund derer bedeutenden Funktionen, wie der Biogenese von Caveolae, der Regulation der Cholesterolemie sowie der Signaltransduktion äußerst vielfältig. Darüber hinaus können über die zellbiologischen Konsequenzen einer veränderten Expression möglicherweise neue Erkenntnisse über bislang unbekannt Funktionen der Caveoline gewonnen werden. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit Faktoren identifiziert und Kontrollmechanismen untersucht werden, welche die Caveolin-Expression beeinflussen. Die Untersuchungen wurden zum großen Teil in neuronalen Zellsystemen durchgeführt. Allerdings soll bei der Diskussion der Ergebnisse auch die Übertragbarkeit der gewonnenen Daten in andere Zellsysteme berücksichtigt werden.

Es wurden drei Faktoren identifiziert, das Steroidhormon Oestrogen und $ER\alpha$, der Wachstumsfaktor $TGF\alpha$ und der sekundäre Botenstoff cAMP, welche die Caveolin-Genexpression in den analysierten Zellmodellen negativ regulieren. Die Untersuchungen konzentrierten sich hierbei auf die Caveolin-Subtypen 1 und 2, da Caveolin-3 aufgrund seiner gesonderten Rolle als hauptsächlich muskelspezifischer Subtyp in den analysierten Zellsystemen nicht detektiert werden konnte. Die an der Regulation beteiligten molekularen Mechanismen sowie die potentiellen funktionellen Auswirkungen der Caveolin-1/-2-Genregulation sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

4.1 $ER\alpha$ -vermittelte Suppression der Caveolin-Expression in SK-N-MC-Zellen

Ende der 90er Jahre wurde Caveolin-1 als neues Mitglied der Co-Aktivatoren des $ER\alpha$ identifiziert. Es konnte gezeigt werden, daß Caveolin-1 die genomische Aktivität des $ER\alpha$ verstärkt (Schlegel et al. 1999). Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der erstmalig beobachteten Regulation der Caveolin-Genexpression durch Oestrogen und Oestrogen-Rezeptoren (ER). In der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-MC wurden die differentiellen Effekte von $ER\alpha$ und $ER\beta$ auf die Caveolin-Expression untersucht. Neuroblastom-Zellen zeigen morphologische und funktionelle Eigenschaften unreifer Neuronen und lassen sich aufgrund ihres Proliferationsverhaltens molekulargenetisch leicht manipulieren. Da SK-N-MC Zellen keine funktionellen ERs exprimieren (Manthey et al. 2001), wurden sie als Modell zur stabilen Überexpression der beiden Oestrogen-Rezeptor-Subtypen herangezogen. Die Ergebnisse aus diesem Zellmodell könnten sowohl für tumorbiologische als auch neurobiologische Vorgänge von hoher Relevanz sein.

Die ektopische Expression des ER α in sogenannten SK-ER α -Zellen führt zu einer nahezu vollständigen, ligand-unabhängigen Inaktivierung der Caveolin-Genexpression. Die Expression wird bereits auf Transkriptionsebene supprimiert und betrifft beide Caveolin-Subtypen 1 und 2 (Abb. 8). Dagegen bewirkt die ektopische Expression des ER β in SK-ER β -Zellen keine Änderung in der Caveolin-Expression. Auch nach 48 Stunden Oestrogen-Exposition sind in diesen Zellen die Caveolin-1/-2-Spiegel unverändert. Darüber hinaus hebt der ER β die supprimierende Wirkung des ER α auf die Caveolin-Expression auf, wie in den erzeugten SK-ER α/β -Zellen demonstriert wurde (Abb. 6 & 8).

Eine mögliche Ursache für die differentiellen Effekte der Rezeptor-Subtypen auf die Caveolin-Expression könnte in deren distinkten biochemischen Eigenschaften liegen. Obwohl der modulare Aufbau beider Rezeptor-Subtypen ähnlich ist, treten in vielen Proteinabschnitten deutliche Sequenzdiversitäten auf. Diese spiegeln sich bereits in der unterschiedlichen Größe der Rezeptoren wieder. Die Aminosäuresequenz des ER α besteht aus 595 Aminosäuren, und die des ER β aus 530 Aminosäuren. Beim Vergleich beider Rezeptor-Subtypen ist die stärkste Konservierung der Aminosäuresequenz in der DNA-Bindungsdomäne mit über 95% Homologie zu finden. Für die Transaktivierungsdomäne AF-1 beträgt die Homologie lediglich 17,5%, für die Ligandbindungsdomäne 59% und für den C-Terminus 17,9% (Kuiper et al. 1996; Mosselman et al. 1996).

Trotz der bestehenden Sequenzunterschiede besitzen ER α und ER β eine ähnliche Oestrogen- und ERE-Bindungs-Affinität (Kuiper et al. 1997). Werden beide Rezeptor-Subtypen in der Zelle co-exprimiert, bilden sie Heterodimere aus, welche eine Ergänzung zu den Rezeptor-Homodimeren darstellen. Es verdichten sich die Hinweise, daß Hetero- und Homodimere ein Zelltyp-spezifisches unterschiedliches Transaktivierungsprofil der ERE-vermittelten Transkription aufweisen. So kann ER β die transkriptionelle Aktivität des ER α in bestimmten Zellsystemen inhibieren (Hall und McDonnell 1999; Pettersson et al. 2000). In der Tat bestätigen unsere Reporter-Assays, daß die Co-Expression beider Rezeptor-Subtypen in SK-ER α/β -Zellen eine niedrigere Luciferase-Expression nach Oestrogen-Behandlung auslöst als in SK-ER α - oder SK-ER β -Zellen (Abb. 5).

Auch im Falle der Caveolin-Genregulation scheint ER β als Gegenspieler eines ER α -vermittelten Effekts zu fungieren, wobei der antagonistische Effekt weit stärker scheint als in der Luciferase messbaren Reporterregulation.

4.1.1 Ligand-unabhängige Suppression der Caveolin-Expression durch ER α

Der supprimierende Effekt des ER α auf die Caveolin-Genexpression erscheint in Abwesenheit des Liganden Oestrogen (Abb. 6 & 8). Dieser ligand-unabhängige Effekt ließe sich mit einer Auto-Aktivierung des Rezeptors in SK-N-MC-Zellen erklären. Bedingt durch

die ektoxische Überexpression liegen hohe Konzentrationen des ER α in der Zelle vor. Die erhöhte Konzentration könnte eine Gleichgewichtsverlagerung der zellulären Rezeptor-Population vom Zytoplasma in den Zellkern bewirken. *In vitro* Studien belegen, daß ERs selbst in Abwesenheit eines Liganden mit der chromosomalen DNA interagieren (Reese und Katzenellenbogen 1992). Des Weiteren spielen Co-Aktivatoren für die ligand-unabhängige Aktivierung des Rezeptors eine entscheidende Rolle. Neben Caveolin-1 wurde Cyclin D1 als Co-Aktivator des ER α identifiziert, welches direkt mit dem ligand-ungebundenen Rezeptor interagiert (Lamb et al. 2000). Cyclin D1 rekrutiert weitere Co-Aktivatoren mit intrinsischer HAT-Aktivität an den DNA-gebundenen Rezeptorkomplex und stabilisiert auf diese Weise den Transkriptionsapparat.

Es liegen zwei Hinweise für die ligand-unabhängige Aktivierung des ER α in SK-ER α -Zellen vor. Zum einen zeigen SK-ER α -Zellen eine erhöhte Basalaktivität des ERE-Luciferase-Reporters im Vergleich zu parentalen SK-N-MC-Zellen (Daten nicht gezeigt). Zum anderen wird die Expression von zwei Oestrogen-Zielgenen, pS2 und CGA, durch die ektoxische Expression des ER α in ligand-unabhängiger Weise induziert (Abb. 9).

Somit könnte der ER α die Expression eines Faktors induzieren, welcher die Caveolin-Genexpression in SK-ER α -Zellen inhibiert.

Alternativ zu diesem indirekten Mechanismus könnte ER α auch unmittelbar durch physikalische Interaktion mit den Caveolin-Genpromotoren an der Caveolin-Suppression beteiligt sein.

Generell ist über die molekularen Mechanismen der ER-vermittelten Inhibition der Genexpression wenig bekannt. Synthetische Antagonisten des ER α wie Tamoxifen bewirken die transkriptionelle Repression bestimmter ER-Zielgene. Dieser Repression liegt vermutlich die Antagonist-induzierte Rekrutierung von Co-Repressoren an den ER α zu Grunde (Shang et al. 2000). Die Co-Repressoren, wie SMRT oder NCoR, rekrutieren wiederum Histon-Deacetylase (HDAC)-Komplexe an den Genpromoter (Nagy et al. 1997). Durch die Kondensation des Chromatins in Folge der Deacetylierung von Histonen wird die Transkription des betreffenden Gens inhibiert. Von Mazumdar und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, daß ER α über MAT1 als Adaptermolekül auch ligand-unabhängig mit HDAC-Molekülen interagiert (Mazumdar et al. 2001).

Ob eine zielgerichtete, ER α -vermittelte Rekrutierung von HDAC-Komplexen an die Promoterregionen der Caveolin-Gene in der Tat für die Inhibition der Caveolin-Transkription verantwortlich ist, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

4.1.2 Epigenetische Faktoren der Caveolin-Suppression in SK-ER α -Zellen

Die vollständige Suppression der Caveolin-Transkription in SK-ER α -Zellen und die fehlende Reversibilität dieses Prozesses nach Inhibition des ER α mit dem Antagonisten ICI 182 780 wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben, ließen auf einen permanenten Stilllegungsmechanismus schließen.

Effiziente Mechanismen zur konstitutiven Inaktivierung der Genexpression basieren oftmals auf Veränderungen in epigenetischen Abläufen. Diese können sich auf molekularer Ebene in der differentiellen Methylierung von Cytosinresten innerhalb von CpG-Dinukleotiden und der biochemischen Modifikation von Histon-Molekülen manifestieren. Circa 75% der CpG-Dinukleotide des humanen Genoms liegen stark methyliert vor (Ehrlich und Wang 1981). Ausnahme bilden CpG-Inseln im 5'-Bereich aktiv transkribierter Gene. Bei CpG-Inseln handelt es sich um DNA-Abschnitte mit einem hohen GC-Gehalt sowie einer hohen Frequenz von CpG-Dinukleotiden relativ zum gesamten Genom (McClelland und Ivarie 1982). Die Hypomethylierung dieser Abschnitte ist oft Voraussetzung für die aktive Transkription der mit ihnen assoziierten Gene. Dagegen bewirkt die *de novo* Methylierung von CpG-Dinukleotiden katalysiert durch DNA-Methyltransferasen häufig eine transkriptionelle Repression des betroffenen Gens. Vermittelt werden die repressiven Effekte über Methyl-CpG-Bindeproteine, die einerseits die Anlagerung basaler Transkriptionsfaktoren an die DNA verhindern und andererseits Histon-Deacetylasen (HDAC) an die methylierten Promoter-Regionen rekrutieren (Ng und Bird 1999).

Sequenzanalysen des Caveolin-1- und Caveolin-2-Promoters bestätigen das Vorkommen von CpG-Inseln, die sich bis in das erste Exon der entsprechenden Gene hinein ausdehnen (Engelman et al. 1999a). In Fibroblasten mit abundanter Caveolin-1-Expression wurde von Engelman und Mitarbeitern eine Hypomethylierung des Caveolin-1-Promoters nachgewiesen. Dagegen liegen in Caveolin-1-negativen Brusttumor-Zelllinien bestimmte CpG-Dinukleotide derselben Promoter-Region methyliert vor. Daher favorisierten die Autoren dieser Studie die Hypothese einer DNA-Methylierungs-abhängigen Stilllegung der Caveolin-1-Expression in Brusttumor-Zelllinien.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch Caveolin-1-exprimierende parentale SK-N-MC-Zellen und SK-ER β - bzw. SK-ER α/β -Zellen eine Hypomethylierung des Caveolin-1-Genpromoters aufweisen. Der Verlust der Caveolin-1-Expression in SK-ER α -Zellen geht mit der *de novo* Methylierung bestimmter CpG-Dinukleotide des Promoters einher. Von der Modifikation sind präferentiell CpG-Dinukleotide am 5'-Ende der CpG-Insel

betroffen. Dagegen liegen 17 der insgesamt 24 untersuchten CpG-Stellen in SK-ER α -Zellen weiterhin unmethyliert vor (Abb. 12).

Durch pharmakologische Inhibition der DNA-Methyltransferasen wird die Expression von Caveolin-1 in SK-ER α -Zellen bei gleichzeitiger Demethylierung der analysierten CpG-Stellen partiell reaktiviert. Auch die Inhibition der Histon-Deacetylasen führt zu einer teilweisen Reversion der Caveolin-1-Transkription (Abb. 14).

Aufgrund dieser Ergebnisse könnten epigenetische Faktoren wie DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung für die konstitutive Inaktivierung der Caveolin-1-Genexpression in SK-ER α -Zellen mitverantwortlich sein.

Über die molekularen Mechanismen, die zur Etablierung neuer DNA-Methylierungsmuster führen, herrscht weitgehend Unklarheit. Im Folgenden sollen drei mögliche, in der Literatur diskutierten Modelle für die *de novo* Methylierung von Promotersequenzen erörtert werden.

In verschiedenen Tumormodellen werden Veränderungen im DNA-Methylierungsprofil auf eine Dysregulation der DNMT-Expression zurückgeführt (Mizuno et al. 2001; Robertson et al. 1999). Beispielsweise konnte für den durch das Oestrogen-System positiv-regulierten Transkriptionsfaktor *c-fos* gezeigt werden, daß dieser eine drastische Hochregulation der DNMT1-Expression in Fibroblasten induziert und dadurch ein verändertes DNA-Methylierungsmuster hervorruft (Bakin und Curran 1999). Als Folge der erhöhten DNMT-Spiegel können CpG-Inseln bestimmter Tumorsuppressorgene hypermethyliert vorliegen. Jedoch erfolgt die Methylierung von CpG-Inseln nicht zielgerichtet. Sie stellt vielmehr einen Prozess der natürlichen Selektion solcher Zellen dar, welche durch die Inaktivierung relevanter Tumorsuppressorgene mittels DNA-Methylierung gegenüber Zellen mit den entsprechenden, funktionell aktiven Tumorsuppressorgen einen Wachstumsvorteil aufweisen (Esteller 2002). Paradoxerweise geht die lokale Hypermethylierung von CpG-Inseln häufig mit einer genomweiten Demethylierung einher (Ehrlich 2002). Von der Demethylierung können beispielsweise Retrotransposons wie die LINE-1-Sequenzen betroffen sein, die in untransformierten, somatischen Zellen hypermethyliert und dadurch in einem inaktiven Zustand gehalten werden (Jurgens et al. 1996; Takai et al. 2000; Hata und Sakaki 1997).

Beim Vergleich von SK01- und SK-ER α -Zellen treten keine Unterschiede im Expressionsniveau von DNMT1, DNMT3a und DNMT3b auf (Abb. 16). Auch der Methylierungszustand der LINE-1-Sequenzen ist in beiden Zelltypen vergleichbar (Abb. 18). Daher ist die durch die Überexpression des ER α -verursachte *de novo* Methylierung des Caveolin-1-Promoters nicht einfach mit erhöhten DNMT-Spiegeln in SK-ER α -Zellen erklärbar.

Eine zweite Hypothese zur Etablierung neuer Methylierungsmuster besagt, daß epigenetische Veränderungen lediglich als sekundäres Ereignis zur Stabilisierung transkriptionell inaktiven Chromatins beitragen. Aktiv transkribierte Promoterbereiche werden hierbei durch die Assoziation mit Transaktivatoren, HATs und der basalen Transkriptionsmaschinerie vor *de novo* Methylierung geschützt. Bewirkt ein transkriptioneller Repressor die Dissoziation der Transkriptionsfaktoren von der DNA, breitet sich die Methylierung von den flankierenden, hypermethylierten DNA-Bereichen in den nun ungeschützten Promoterbereich aus (Sun und Elgin 1999).

Möglicherweise induziert der ER α die Expression eines transkriptionellen Repressors der Caveolin-Expression in SK-ER α -Zellen. In der Tat tritt die Methylierung des Caveolin-1-Promoters tendentiell im 5'-Randbereich der enthaltenen CpG-Insel auf, eine Beobachtung, welche die zweite Hypothese stützt.

Die dritte Hypothese fokussiert sich auf die Schnittstelle zwischen endogenen ER α -Co-Repressoren, wie SMRT und NCoR, und der Methylierungsmaschinerie der Zelle. Wie bereits beschrieben, interagieren ERs auch in Abwesenheit von Liganden unter bestimmten Umständen mit SMRT oder NCoR (Mazumdar et al. 2001). Die Interaktion dieser Co-Repressoren mit HDAC- sowie DNMT-Molekülen kann über den Sin3A-Komplex gebrückt werden (Alland et al. 1997; Geiman et al. 2004). Die chronologische Abfolge bei der Etablierung des inaktiven Chromatin-Status ist nicht notwendigerweise über die initiale Methylierung und anschließende Histon-Deacetylierung festgelegt. Für bestimmte Promoterregionen wurde auch die umgekehrte Reihenfolge beim Ablauf dieser genetischen Prozesse postuliert (Robertson und Wolffe 2000).

So ist es prinzipiell vorstellbar, daß ER α über die Interaktion mit Co-Repressoren direkt den Methylierungszustand des Caveolin-1-Promoters modifiziert. Allerdings werden die Mechanismen der ER-vermittelten Repression durch NCoR oder SMRT in der Literatur kontrovers diskutiert und müssen daher mit Vorsicht interpretiert werden.

In Anbetracht der primären Rolle des Oestrogens und seiner Rezeptoren als Transaktivatoren der Gentranskription wird in dieser Arbeit die zweite Hypothese als Mechanismus der ER α -vermittelten Caveolin-1-Stillegung favorisiert.

4.1.3 Chronische pränatale Oestrogen-Behandlung

Die für SK-N-MC Zellen erhaltenen Befunde zur transkriptionellen Suppression von Caveolin-1/-2 durch ER α stellen vermutlich nicht nur ein zellbiologisches Phänomen dar, sondern könnten auch für entwicklungsbiologische Fragestellungen relevant sein. Diesem

Aspekt wurde in einem Tiermodell der pränatalen Oestrogen-Langzeitbehandlung nachgegangen. Fötale Mäuse in Utero wurden zwischen Embryonaltag 9,5 und 16,5 einer chronischen Oestrogen-Behandlung unterzogen. Vier Wochen nach der Geburt wurde die hypothalamische Hirnregion der Neugeborenen auf veränderte Caveolin-1-Spiegel im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen untersucht. Der Hypothalamus weist eine hohe ER α -Expression auf und ist damit sehr sensitiv gegenüber dem Steroidhormon Oestrogen (Shughrue et al. 1997).

Oestrogen bewirkte eine Reduzierung der Caveolin-1-Spiegel im Hypothalamus. Die verminderten Caveolin-1-Spiegel waren selbst über vier Wochen nach Beendigung der Behandlung feststellbar (Abb. 21). Diese Beobachtung läßt auf eine permanente Suppression der Caveolin-1-Expression schließen. Ob die permanente Reduktion der Caveolin-1-Expression in dieser Hirnregion auf einen epigenetischen Mechanismus zurückzuführen ist, konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geklärt werden. Im Allgemeinen exprimieren sowohl unreife als auch ausdifferenzierte Neuronen DNA-Methyltransferasen (Goto et al. 1994). Zudem ist bekannt, daß die Differenzierung von Neuronen mit Änderungen im DNA-Methylierungsmuster sowie mit biochemischen Modifikationen der Histone einhergeht (Futamura et al. 1995; Persengiev und Kilpatrick 1996; Barresi et al. 1999; Mattson 2003;). Werden diese epigenetischen Abläufe durch DNMT- oder HDAC-Inhibitoren unterbunden, findet keine adäquate Reifung der betroffenen Neuronen statt. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die chronische Applikation von Oestrogen in kritischen Perioden der Entwicklung epigenetische Veränderungen hervorrufen kann (McLachlan et al. 2001). Daher scheint es möglich, daß der Caveolin-1-Promoter nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* epigenetischen Modifikationen unterliegt, die durch eine chronische Oestrogen-Exposition verursacht werden.

Zusammenfassend zeigen *in vitro* und *in vivo* Resultate der vorliegenden Arbeit eine negative Regulation des ER α Co-Aktivators Caveolin durch Oestrogen und ER α in neuronalen Zellen. Ein vergleichbarer supprimierender Effekt des Oestrogen-Systems auf die Caveolin-Expression wurde im Laufe dieser Arbeit auch für weitere zelluläre Paradigmen beschrieben, welche Endothelzellen und Brust-Tumorzelllinien *in vitro* sowie Uterusmuskelzellen *in vivo* einschlossen (Pelligrino et al. 2000; Razandi et al. 2002; Turi et al. 2001). Diese Studien untermauern die repressiven Effekte der Oestrogenachse auf die Caveolin-Expression und weisen auf einen generellen Genregulationsmechanismus hin. Im folgenden Abschnitt sollen die möglichen funktionellen Konsequenzen einer Oestrogen/ER α -vermittelten Caveolin-Suppression im Hinblick auf tumor- und neurobiologische Aspekte diskutiert werden. Insbesondere werden hierbei bestehende Parallelen zwischen bekannten Oestrogen-Effekten und Folgen der Caveolin-Suppression beschrieben.

4.1.4 Caveolin als Mediator klassischer Oestrogen-Effekte?

4.1.4.1 Tumorbiologische Aspekte der ER α -vermittelten Caveolin-Suppression

Das Oestrogen-System kontrolliert die Proliferation und Differenzierung bestimmter Zellsubpopulationen im Brustgewebe, Uterus, Knochengewebe sowie im ZNS. In vielen Zellmodellen wirkt Oestrogen dabei als mitogener Faktor. Tritt eine Störung im Oestrogen-Hormonhaushalt oder eine aberrante Expression der ERs auf, fördert Oestrogen unter pathologischen Bedingungen die Entstehung und Progression verschiedener Tumorarten. Hierbei handelt es sich primär um Tumoren des Brustgewebes, des Endometriums und der Adenohypophyse.

Die tumorfördernden Eigenschaften des Oestrogens sind am besten für Brusttumoren belegt (Hilakivi-Clarke et al. 2002). Während der normalen Entwicklung findet man die höchsten ER α -Spiegel in proliferierenden, undifferenzierten Zellen des Brustgewebes. Im Laufe der Differenzierung der weiblichen Brustdrüse wird die Expression des ER α stark herunterreguliert (Russo et al. 1999; Shoker et al. 1999). Dagegen ist in 60% der Brusttumoren die Expression des ER α im Vergleich zu normalem Gewebe signifikant erhöht. Der mitogene Effekt des Oestrogens, der durch den ER α -Subtyp vermittelt wird, beruht auf der Verkürzung der G1-Phase des Zellzyklus (Leung 1987). In den letzten Jahren wurden eine Reihe von ER α -Zielgenen identifiziert, welche für den beschleunigten Ablauf der G1-Phase mitverantwortlich sind. Hierzu zählen die Cycline D und E sowie die Transkriptionsfaktoren c-myc, c-jun und c-fos (Altucci et al. 1996; Kamiya et al. 1996; Murphy et al. 1987; Planas-Silva und Weinberg 1997). Die resultierende, erhöhte Mitoserate stellt einen für die Tumorpromotion entscheidenden Schritt dar, und wird durch Oestrogen/ER α positiv beeinflusst.

Interessanterweise fungiert der ER β -Subtyp häufig als Gegenspieler des ER α . Aus diesem Grund wird dem ER β -Subtyp eine protektive Funktion für das normale Brustgewebe zugeschrieben (Hall et al. 2000). Die Regulation der ER β -Expression erfolgt gegenläufig zu der des ER α , wobei Zellen des ausdifferenzierten Brustgewebes die höchsten ER β -Spiegel aufweisen. Im Zuge der Karzinogenese kommt es zu einer drastischen Verminderung der ER β -Expression (Leygue et al. 1998; Saji et al. 2000).

Abgesehen von gynäkologischen Tumoren fördert Oestrogen auch die Genese bestimmter Tumoren des ZNS. Im ZNS treten neuroendokrine Tumoren der Hypophyse generell am häufigsten auf. Die proliferativen Effekte des Oestrogens betreffen hierbei vor allem die laktotropen Zellen der Adenohypophyse (Walker und Kurth 1993). Die Mehrzahl der Prolaktinome, ca. 70% bis 100%, exprimieren den ER α (Shupnik et al. 1998). Neben der Stimulation der Prolaktin-Expression verstärkt Oestrogen die Expression von Protoonkogenen

wie des *Pituitary Tumor Transforming Gens*, des *Tumor Growth Factor β* (TGF β) und des TGF β -Rezeptors (Melmed 2003).

Die Rolle des Oestrogens bei der Entstehung von astrozytären, besonders aggressiven und kaum behandelbaren Tumoren ist bislang umstritten. Zwar hemmt der partielle ER-Antagonist Tamoxifen die Proliferation bestimmter ER-positiver Glioblastom-Zelllinien, andererseits konnte *in vivo* bisher keine Expression von ER α in astrozytären Tumoren nachgewiesen werden (Liu et al. 2001b; Assimakopoulou et al. 1998). Eine mögliche Beteiligung des Oestrogens an der Entstehung neuronaler Tumoren wie der Neuroblastome ist bislang nicht geklärt.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten belegen eine klare Korrelation zwischen der Überexpression des ER α und der Stilllegung der Caveolin-1/-2-Expression in der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-MC (Abb. 6 & 8). Diese Korrelation kann auf verschiedene Brusttumor-Zelllinien mit endogener ER α -Expression erweitert werden. So zeigen ER α -positive Brusttumor-Zelllinien wie MCF-7 und TD-47 keine Caveolin-1-Expression, wohingegen ER α -negative MDA-MB-231-Zellen Caveolin-1 im hohen Maße exprimieren (Hurlstone et al. 1999).

Caveolin-1 wird aufgrund seiner anti-proliferativen Eigenschaften als potentielles Tumorsuppressorgen betrachtet. In Caveolin-negativen Brusttumoren sowie Ovarial-, Colon- und Nierenzellkarzinom ist der Chromosomenlokus 7q31.1 häufig deletiert (Jenkins et al. 1998; Zenklusen et al. 1994a; Zenklusen et al. 1994b). Auf diesem Chromosomenabschnitt sind die Caveolin-Gene 1 und 2 lokalisiert. Jedoch führen nicht nur Deletionen des Chromosomenlokus zum Verlust der Caveolin-Expression. Auch aktivierte Protoonkogene, wie c-Myc, Neu, Raf, Ras, Src und c-Abl supprimieren die Expression von Caveolin-1, wie für NIH 3T3-Zellen von Engelman und Mitarbeitern demonstriert wurde (Engelman et al. 1999b). Wird die Caveolin-1-Expression mittels Antisense-Technik in NIH 3T3-Zellen gezielt unterdrückt, beobachtete man eine Hyperaktivierung der MAP-Kinasekaskade sowie eine Transformation des Fibroblasten-Phänotyps (Galbiati et al. 1998a). Weiterhin wurde gezeigt, daß embryonale Mausfibroblasten aus Caveolin-1-Knock-Out-Tieren den Zellzyklus mit einer höheren Geschwindigkeit durchlaufen als Fibroblasten aus Wildtyp-tieren (Razani et al. 2001a). Dies resultiert in einer dreifach erhöhten Anzahl von Zellen nach einem Kultivierungszeitraum von zehn Tagen. Zurückzuführen sind die anti-proliferativen Eigenschaften von Caveolin-1 vermutlich auf seine inhibitorischen Effekte auf eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen, die unter pathologischen Bedingungen die Zelltransformation fördern (Razani et al. 2001b).

Die negative Regulation der Caveolin-Expression durch ER α könnte somit einen bislang nicht bekannten, zusätzlichen Mechanismus der proliferativen Effekte Oestrogens auf bestimmte Zellpopulationen während der Karzinogenese darstellen. Möglicherweise induziert Oestrogen/ER α die Expression von Protoonkogenen, wie beispielsweise c-myc, welche ihrerseits die Caveolin-Expression unterdrücken. Als Folge der fehlenden Expression von Caveolin-1 könnte die beobachtete Hyperphosphorylierung von ERK1/2 in SK-ER α -Zellen eintreten (Abb. 20), welche einen potentiellen Transformationsprozess weiter antreiben würde. Die Beobachtung, daß der ER β -Subtyp die supprimierende Wirkung ER α s auf die Caveolin-Expression vollständig aufhebt, unterstreicht die für den ER β postulierte wichtige Gegenspielerfunktion zum ER α -Subtyp.

4.1.4.2 Neurobiologische Aspekte der ER α -vermittelten Caveolin-Suppression

Neben den klassischen Oestrogen-Zielgeweben kontrolliert Oestrogen auch wichtige neurobiologische Prozesse im ZNS. Hierbei übt Oestrogen permanente, geschlechtsspezifische Effekte auf das unreife Gehirn, sowie transiente Effekte auf das adulte Gehirn aus. Während der prä- und perinatalen Entwicklung des ZNS spielt Oestrogen bei der Organisation kognitiver und motorischer Funktionen sowie neuroendokriner Schaltkreise eine wichtige Rolle (Beyer 1999). Hierbei verursacht Oestrogen in einer kritischen perinatalen Periode eine irreversible, geschlechtsspezifische Umorganisation bestimmter Regionen des ZNS (Gorski und Wagner 1965). Besonders intensiv ist die präoptische Region des Hypothalamus untersucht, welche in männlichen Individuen ca. fünfmal größer ist als in weiblichen Individuen (Gorski et al. 1980). Das größere Volumen ist auf eine erhöhte Anzahl von Neuronen zurückzuführen (Jacobson et al. 1985), die durch die perinatale Wirkung Oestrogens verursacht wird (Jacobson und Gorski 1981). Neben den wachstumsfördernden Effekten verändert Oestrogen auch nachhaltig die Morphologie glialer und neuronaler Zellen, indem es beispielweise die Extension von Neuriten und deren Verzweigungsgrad verstärkt (Gould et al. 1990; Reisert et al. 1987).

Die Synthese von Oestrogen, welches durch Aromatisierung aus Testosteron entsteht, erfolgt in Neuronen verschiedener Hirnregionen. Das Enzym Aromatase aus der Cytochrom P450-Familie katalysiert die Umwandlung des Substrats Testosteron zu Oestrogen (Reddy et al. 1974) und wird in Neuronen sowohl männlicher als auch weiblicher Embryos im Hypothalamus, Hippokampus, Zwischenhirn und in der Amygdala auf hohem Niveau exprimiert (Beyer 1999). Auch die beiden ER-Subtypen werden, abhängig von Entwicklungsstadium und Hirnregion, in Zellen des ZNS exprimiert (Santagati et al. 1994; Shughrue et al. 1997). Es gibt Hinweise, daß in bestimmten Hirnregionen beide

Rezeptorsubtypen co-exprimiert werden. Generell findet man die höchste Dichte ER-positiver Zellen im Vorderhirn, Hypothalamus und in der Amygdala.

Abgesehen von wenigen Ausnahmen wirkt Oestrogen auf zellulärer Ebene als wachstumsfördernder, neurotropher Faktor. Auf molekularer Ebene reguliert Oestrogen langanhaltend die Expression von neuronalen Zytoskelettproteinen (z.B. Mikrotubulus-assoziierte Proteine, GAP43, Neurofilamentproteine) (Ferreira und Caceres 1991; Lustig et al. 1991; Scoville et al. 1997), und transient die Expression von Neuropeptiden (z.B. Vasopressin, Oxytocin, Prolaktin) sowie von Funktionsenzymen, die an der Synthese von Neurotransmittern beteiligt sind (z.B. Acetylcholintransferase, Tyrosin-Hydroxylase) (Arai et al. 1996; Harlan 1988). Weiterhin beeinflusst Oestrogen das sensitive Gleichgewicht zwischen Zellüberleben und Apoptose. Dieser Prozess spielt für die normale Entwicklung des ZNS und krankheitsassoziierte neurodegenerative Phänomene eine essentielle Rolle (zur Übersicht: Behl 2002b). Die Expression anti-apoptotischer Gene wie Bcl-2 und Bcl-X wird *in vitro* durch Oestrogen stimuliert (Pike 1999; Singer et al. 1998). Eine weitere Ursache für die protektiven, neurotrophen Effekte Oestrogens liegt in der Interaktion des Steroidhormons mit dem Neurotrophin-System (Toran-Allerand et al. 1999). Neurotrophine gehören zur Familie der Wachstumsfaktoren, deren Effekte über zwei Klassen strukturell unterschiedlicher Membranrezeptoren vermittelt werden. Die Neurotrophine NGF und BDNF aktivieren die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen TrkA und TrkB, welche überwiegend neurotrophe Prozesse induzieren. Der zweite Rezeptortyp, p75^{NTR}, ist mit der Fas/CD40-Rezeptorfamilie verwandt und induziert nach Aktivierung pro-apoptotische Prozesse. p75^{NTR} bindet alle Neurotrophine mit geringerer Affinität und moduliert somit die Aktivität der Trk-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Oestrogenbehandlung von PC-12 Zellen oder von sensorischen Neuronen führt einerseits zu einer permanenten Verstärkung der TrkA-Transkription, und andererseits zu einer transienten Verringerung der p75^{NTR}-Transkription (Sohrabji et al. 1994).

Neben seinen genomischen Effekten moduliert Oestrogen die Aktivität zahlreicher Signaltransduktionswege sowie bestimmter Membranrezeptoren. Zum Beispiel stimuliert Oestrogen über mutmaßlich membranassoziierte ERs sowohl PI3-Kinase- als auch MAP-Kinase-abhängige Signaltransduktionswege in verschiedenen neuronalen Zellmodellen (Ivanova et al. 2002; Manthey et al. 2001). Beide Signalwege bieten unter gewissen Bedingungen einen zellulären Schutzmechanismus vor apoptotischen Stimuli (Fitzpatrick et al. 2002; Yu et al. 2004).

Interessanterweise sind Hauptkomponenten der PI3-Kinase und MAP-Kinase-abhängigen Signaltransduktionswege in Lipid Rafts oder Caveolae konzentriert. Auch der ER α -Subtyp konnte in dieser Membransubdomäne identifiziert werden (Kim et al. 1999; Razandi et al. 2002). Diese Befunde unterstreichen die wichtige Rolle von Lipid Rafts, Signalmoleküle

koordiniert in räumliche Nachbarschaft zu bringen, um damit die funktionelle Interaktion unterschiedlicher Signaltransduktionswege zu ermöglichen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die chronische und pränatale Exposition von Oestrogen im Hypothalamus männlicher Mäuse zu einer permanenten Reduktion des Caveolin-1-Spiegels führt (Abb. 21). Die verringerte Expression von Caveolin-1 im Hypothalamus könnte dabei auch zu den anti-apoptotischen Effekten des Oestrogens beitragen. Caveolin-1 agiert aufgrund seiner Eigenschaften als Tumorsuppressorgen in vielen Zellmodellen als pro-apoptotischer Faktor. NIH 3T3-Fibroblasten, die reduzierte Caveolin-1-Spiegel aufweisen, sind beispielsweise gegen bestimmte apoptotische Stimuli resistent (Liu et al. 2001a). Dies äußert sich unter anderem in einer verringerten Aktivität der Caspase-3. Zum Teil sind die pro-apoptotischen Effekte von Caveolin-1 auf dessen direkte Interaktion mit der PI3-Kinase zurückzuführen. Der PI3-Kinase-abhängige Signaltransduktionsweg fördert in der Regel das Zellüberleben, wobei durch rekombinante Überexpression von Caveolin-1 die Aktivität der PI3-Kinase inhibiert wird (Zundel et al. 2000).

Des Weiteren interagiert Caveolin-1 mit Komponenten des Neurotrophin-Systems. Auch die Rezeptoren für Neurotrophine sind in Lipid Rafts bzw. Caveolae lokalisiert, wie für PC-12-Zellen gezeigt werden konnte (Peiro et al. 2000). Caveolin-1 bindet direkt an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase TrkA und verringert das Ausmaß der NGF-induzierten Autophosphorylierung des Rezeptors (Bilderback et al. 1999). Aus diesem Grund könnte Oestrogen neben der Hochregulation der TrkA-Transkription auch über eine Verringerung der Caveolin-1-Expression die Aktivität dieses Neurotrophin-Rezeptors verstärken.

Zusammenfassend könnten die neurotrophen Effekte Oestrogens, zumindest in bestimmten Hirnregionen, partiell auf eine verringerte Expression von Caveolin-1 zurückzuführen sein.

4.2 Effekt von TGF α auf die Caveolin-Expression in Astrozyten

Neben Oestrogen wurde der Effekt eines weiteren mitogenen Faktors, *Transforming Growth Factor α* (TGF α), auf die Caveolin-Expression in astroglialen Zellen untersucht. Astrozyten vom Typ I weisen *in vitro* eine hohe Expressionsrate der Caveolin-Subtypen 1 und 2 auf und eignen sich daher als Zellmodell, um verschiedene molekulare Mechanismen der Caveolin-Genregulation zu untersuchen (Abb. 22).

TGF α ist ein aus 50 Aminosäureresten bestehendes Polypeptid, welches zur Familie des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) gehört. Die Sekretion von TGF α erfolgt durch die proteolytische Spaltung des membranständigen Vorläufermoleküls pro-TGF α . Katalysiert wird die Proteolyse von der Metalloproteinase TACE (TNF α -Converting Enzyme), die Mitglied der ADAM-Protease-Familie ist (Peschon et al. 1998). TGF α zeigt eine weitläufige

Verteilung im Organismus und ist besonders in der Haut, in respiratorischen und endokrinen Organen, in hämatopoetischen Zellen sowie im ZNS zu finden (Lee et al. 1995). Sowohl Astrozyten als auch Neurone des unreifen und adulten Gehirns exprimieren TGF α und den zugehörigen EGF-Rezeptor (EGF-R) (Kaser et al. 1992; Wang et al. 1989).

TGF α ist Ligand des EGF-R-Subtyps erb B1, bei welchem es sich um eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase handelt. Die Ligand-vermittelte Rezeptordimerisierung und Autophosphorylierung induziert die Aktivierung bestimmter Signaltransduktionswege. Zum einen binden die Adaptermoleküle Grb2/Sos an die zytosolische Domäne des aktivierten Rezeptors und rekrutieren die GTPase Ras an den Rezeptorkomplex. In der Folge initiiert Ras die sequentielle Phosphorylierung von Raf, MEK1/2 und ERK1/2. Ferner binden an anderen Signalwegen beteiligte Enzyme an die aktivierten Rezeptordimere, wie für die Phospholipase C γ (PLC γ) und PI3-Kinase gezeigt wurde. Aktivierte PLC γ hydrolysiert das in der Plasmamembran verankerte Lipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Aus der Hydrolyse-Reaktion gehen die Botenstoffe 1,2-Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat hervor. DAG aktiviert die Proteinkinase C, Inositol-1,4,5-trisphosphat bewirkt die Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die aktivierte PI3-Kinase hingegen phosphoryliert die Effektor-Proteinkinase Akt, welche dadurch in die katalytisch aktive Form übergeht.

Die Wirkungen von TGF α auf Astrozyten sind vielfältig, wobei die beobachteten *in vitro* und *in vivo* Effekte teilweise voneinander abweichen (Junier 2000). Im ZNS unterstützt TGF α reaktive Prozesse und die Ausbildung von Astrogliosen (Rabchevsky et al. 1998), welche bei neurodegenerativen Erkrankungen sowie bei Traumata des ZNS auftreten. Im Zuge einer Astroglieose durchlaufen Astrozyten drastische morphologische und biochemische Veränderungen (Eddleston und Mucke 1993), die von der Hochregulation der endogenen TGF α - und EGF-R-Expression begleitet werden (Junier et al. 1994). Hierbei stellt die erhöhte TGF α -Expression einen parakrinen Mechanismus zum Erhalt des reaktiven Prozesses dar. Die Astrozyten migrieren zum Ort der Entzündung (Faber-Elman et al. 1996) und entwickeln Zellfortsätze mit großem Durchmesser (Rabchevsky et al. 1998). Durch Freisetzung neurotropher Faktoren können sie das Überleben von Neuronen positiv beeinflussen.

In vitro erhöhen erb B1-Liganden zum einen die Mitoserate von Astrozyten (Leutz und Schachner 1981), zum anderen fördern sie die funktionelle Differenzierung der astroglialen Zellen (Junier 2000). *In vivo* werden diese mitogenen Effekte nicht beobachtet (Craig et al. 1996), was zum Teil auf den wachstumshemmenden Einfluss von Neuronen auf die Astrozyten-Proliferation zurückgeführt wird. Auch *in vitro* induziert TGF α Veränderungen der Astrozyten-Morphologie, die durch einen bipolaren Phänotyp in Kulturen mit geringer

Zelldichte gekennzeichnet ist (Abb. 23). Biochemisch finden nach TGF α -Exposition Veränderungen im Expressionsprofil bestimmter Gene statt, zu denen der metabotrope Glutamat-Rezeptor mGluR5 und der Glutamat-Transporter GLT-1 gehören (Miller et al. 1995; Zelenai et al. 2000). Die Expression beider Gene wird durch TGF α hochreguliert. Bei GLT-1 handelt es sich um den dominierenden Glutamat-Transporter in kortikalen Astrozyten (Rothstein et al. 1994), der für die Wiederaufnahme des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat aus dem Extrazellulär-Raum verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Protein-Spiegel von Caveolin-1 und -2 in Astrozyten des Kortex und Striatum nach 72-stündiger TGF α -Exposition drastisch reduziert sind (Abb. 25). Die reduzierte Proteinexpression spiegelt sich auch in einer verminderten Transkription beider Gene wieder (Abb. 26 & 27). Interessanterweise wird die durch TGF α -vermittelte Caveolin-1-Suppression nicht durch die Inhibition von MEK1/2 aufgehoben. Daher scheint die supprimierende Wirkung von TGF α in MAP-Kinase-unabhängiger Weise vermittelt zu werden. Andererseits bewirkt eine Inhibition der PI3-Kinase zumindest die partielle Wiederherstellung der Caveolin-1-Expression nach TGF α -Behandlung (Abb. 28). Aus diesem Grund scheint der PI3-Kinase-abhängige Signalweg an der Regulation der Caveolin-1-Expression zumindest teilweise beteiligt. Desweiteren wird der supprimierende Effekt von TGF α auf die Caveolin-1-Expression nahezu vollständig durch HDAC-Inhibitoren aufgehoben (Abb. 29). Somit spielen wahrscheinlich auch in diesem Zellmodell epigenetische Mechanismen wie die Deacetylierung von Histonen bei der Regulation der Caveolin-Genexpression durch TGF α eine Rolle.

Die Reduktion der Caveolin-Expression nach TGF α -Behandlung könnte, ähnlich wie für Oestrogen beschrieben, die proliferativen Effekte dieses Peptidhormons *in vitro* verstärken. Interessant ist auch die beobachtete reziproke Regulation von Caveolin und GLT-1, die nicht nur in kortikalen, sondern ebenso in striatalen Astrozyten auftritt (Abb. 30). Dagegen unterbleibt die TGF α -vermittelte Regulation dieser Gene in Astrozyten aus Kleinhirn und Mittelhirn. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß sowohl die Caveolin-1-, als auch GLT-1-Expression über einen gemeinsamen, PI3-Kinase-abhängigen Signalweg reguliert wird (Abb. 28). Nachdem Caveolin-1 selbst die Aktivität der PI3-Kinase inhibiert, könnte dies einen neuen, potentiellen Rückkopplungsmechanismus darstellen. Damit wäre eine Verstärkung der TGF α -induzierten Expression von GLT-1 über einen Wegfall der Hemmung der PI3-Kinase durch Caveolin-1 denkbar. Eine Beteiligung von Caveolin an der Expressionsregulation bestimmter Gene wurde abgesehen von potentiellen ER-Zielgenen bereits für den Folatrezeptor nachgewiesen, welcher in humanen Ovarialkarzinomzellen durch

die rekombinante Überexpression von Caveolin-1 in seiner Expression supprimiert wurde (Bagnoli et al. 2000). Nachdem Caveolin mit Bestandteilen des Zytoskeletts interagiert (Stahlhut und van Deurs 2000), wäre es grundsätzlich denkbar, daß reduzierte Caveolin-Spiegel auch eine Veränderung in der Zellmorphologie bewirken.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde eine Studie publiziert, welche einen inhibitorischen Einfluss von EGF auf die Caveolin-1-Expression in der Tumorzelllinie A431 beschrieb (Lu et al. 2003). Diese Daten sind im Einklang mit unseren Befunden, da die Polypeptide EGF und TGF α durch Aktivierung desselben Rezeptors, erbB1, wirken. Daher können unsere Befunde offensichtlich auch auf andere Zellsysteme, wie z.B. Tumormodelle, übertragen werden.

4.3 Effekt von cAMP auf die Caveolin-Expression in Astrozyten

Zyklisches AMP (cAMP) ist ein prototypischer intrazellulärer Botenstoff, der in Antwort auf zahlreiche extrazelluläre Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter, gebildet wird. Analog zur Wirkung von TGF α induziert cAMP morphologische und biochemische Veränderungen der astroglialen Zellen *in vitro* (Bridoux et al. 1986). Die morphologischen Veränderungen sind charakterisiert durch die Ausbildung langer Zellfortsätze und gehen mit einer erhöhten Expression von GFAP sowie strukturellen Veränderungen des Actin-Zytoskeletts einher (Anciaux et al. 1997; Goldman und Abramson 1990; Goldman und Chiu 1984). In biochemischer Hinsicht induziert cAMP beispielsweise die Expression des Glutamat-Transporters GLT-1 in einem vergleichbaren Ausmaß wie TGF α (Swanson et al. 1997).

Synthetisiert wird cAMP durch die Adenylat-Cyclase (AC), welche die Zyklisierung von ATP zu cAMP katalysiert. Steigt der cAMP-Spiegel der Zelle an, stehen mehrere Optionen der cAMP-vermittelten Signaltransduktion offen. Zum einen aktiviert cAMP die Proteinkinase A (PKA) über die Freisetzung ihrer katalytischen Ketten. Zum anderen bindet cAMP an den Guanin-Nukleotidaustauschfaktor Epac („exchange protein activated by cAMP“). Nach Bindung von cAMP induziert Epac den Austausch von GDP gegen GTP im Guanin-Nukleotidbindungsprotein Rap1 (Kawasaki et al. 1998). Rap1 ist eine GTPase, die an der Regulation sekretorischer Prozesse sowie der Zelladhäsion beteiligt ist. Desweiteren steuert cAMP auch direkt den Öffnungszustand bestimmter Ionenkanäle (Goulding et al. 1992).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in Folge eines erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegels *in vitro* die Expression von Caveolin-1 und -2 in Astrozyten bereits auf Transkriptionsebene herunterreguliert wird (Abb. 26 & 27). In der Tat weisen differenzierte Astrozyten *in vivo* drastisch reduzierte Caveolin-Spiegel auf, die teils sogar unter der immunologischen Nachweisgrenze liegen (Ikezu et al. 1998b). Interessanterweise wird der supprimierende Effekt von cAMP nicht durch Inhibition der PKA mit der Substanz H89

blockiert (Daten nicht gezeigt). Dies könnte darauf hinweisen, daß die Regulation der Caveolin-Genexpression durch den Epac/Rap-Signalweg moduliert wird. Für CHO-Zellen wurde jedoch eine Beteiligung des PKA-abhängigen Signalweges bei der Suppression der Caveolin-Expression durch cAMP gezeigt (Engelman et al. 1999b).

Ebenso wird die cAMP-induzierte Expression von GLT-1 nicht durch den PKA-Inhibitor vermindert (Daten nicht gezeigt). Es kann aber zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, ob die eingesetzte, nicht-toxische Maximalkonzentration dieses Inhibitors für eine vollständige Inhibition der PKA ausreichend war.

Zusammenfassend könnte die Caveolin- und GLT-1-Expression durch einen PKA-unabhängigen Signalweg reguliert werden. Diese Annahme wird durch die auftretenden Parallelitäten der Hirnregion-spezifischen Regulation unterstützt: während cAMP die Expression von Caveolin und GLT-1 in Striatum und Kortex moduliert, findet keine Regulation in Klein- oder Mittelhirn statt (Abb. 30).

Interessanterweise sind GLT-1-Moleküle zu einem großen Anteil in Lipid Rafts, und nicht Caveolae, von primären Astrozyten lokalisiert (Abb. 31 & 32). Dieser Befund könnte die *in vivo* Situation reflektieren, in der aufgrund der drastisch reduzierten Caveolin-Spiegel der Anteil von Lipid Rafts gegenüber Caveolae verhältnismäßig höher sein muss und daher für membranassoziierte, cholesterol-abhängige Proteine wie GLT-1 präferentiell als Plattform dienen könnte.

4.4 Ausblick

Im Jahre 2001 wurde eine erste Studie über den Phänotyp von Caveolin-1-Knock-Out-Mäusen veröffentlicht, welche bestimmte pathologische Veränderungen aufwies, die jedoch weder während Entwicklung noch im adulten Lebensabschnitt zur Letalität führten (Drab et al. 2001; Razani et al. 2001a). Knock-Out-Tiere zeigten unter anderem eine Lungeninsuffizienz, sowie einen reduzierten vaskulären Muskeltonus *in vitro*. Auch auf zellulärer Ebene manifestierten sich umfangreiche Unterschiede zwischen Knock-Out- und Wildtyp-Tieren. In Zellen der untersuchten Gewebe von Knock-Out-Tieren konnten keine Caveolae-Membrandomänen mehr nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß war die Caveolae-vermittelte Endozytose bestimmter Moleküle wie Albumin stark reduziert. Desweiteren durchliefen embryonale Fibroblasten von Caveolin-1-defizienten Mäusen eine höhere Anzahl von Zellteilungszyklen. In diesem Tiermodell ließen sich interessanterweise keine Caveolin-2-Proteine nachweisen, sodaß dieser Caveolin-Subtyp nicht die zellulären Aufgaben von Caveolin-1 übernehmen konnte.

Die Suppression von Caveolin führt somit *in vivo* zu weitreichenden Veränderungen, wobei über die Regulation der Caveolin-Genexpression, insbesondere in neuronalen Zellsystemen, bislang wenig bekannt ist. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Klassen von Faktoren

vorgestellt, welche die Caveolin-Genexpression in neuronalen Zellsystemen supprimieren. Zu diesen Faktoren gehören das lipophile Steroidhormon Oestrogen und der entsprechende nukleäre Rezeptor $ER\alpha$, der ubiquitäre Wachstumsfaktor $TGF\alpha$ sowie der sekundäre, intrazelluläre Botenstoff cAMP. Zukünftige Studien müssen zeigen, welche konkreten funktionellen Veränderungen aus einer verminderten zellulären Caveolin-Expression hervorgehen, besonders im Hinblick auf die klassischen Wirkungen dieser drei Effektormoleküle in den relevanten Zellmodellen.

5 Zusammenfassung

Caveolae sind vesikuläre Invaginationen der eukaryontischen Zellmembran, die bei einer Vielzahl zellbiologischer Prozesse eine bedeutende Rolle spielen. Die strukturellen und funktionellen Hauptbestandteile der Caveolae sind die Caveolin-Proteine, welche von drei homologen Genen (Caveolin-1,-2,-3) kodiert werden. Die Caveoline stellen die Struktur-Organisatoren der Caveolae dar, und regulieren direkt die Aktivität von zahlreichen Caveolae-assoziierten Rezeptorproteinen und Signalmolekülen. Oftmals werden die pleiotropen Effekte der Caveoline über eine Veränderung der Caveolin-Genexpressionsstärke moduliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche biologische Steuerfaktoren identifiziert, unter deren Kontrolle die Caveolin-Genexpression in neuronalen Zellsystemen steht. Bei diesen Faktoren handelt es sich um das Steroidhormon Oestrogen und seine Rezeptoren, den Wachstumsfaktor TGF α und den sekundären Botenstoff zyklisches AMP (cAMP).

Oestrogen wirkt über die Aktivierung von Oestrogen-Rezeptoren (ERs) im zentralen Nervensystem in der Regel als neurotropher Faktor. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, daß in humanen Neuroblastom-Zellen (SK-N-MC) die stabile, rekombinante Expression des ER α -Subtyps zu einer drastischen Reduktion der Caveolin-1/-2-Transkription führt, und daß in der Folge die zelluläre Caveolin-Biosynthese eingestellt wird. Eine Analyse des Caveolin-1-Gens ergab, daß einhergehend mit der Inaktivierung der Caveolin-1-Transkription eine Vielzahl der im Promoter enthaltenen CpG-Dinukleotide methyliert vorliegen. Durch pharmakologische Inhibition der nukleären DNA-Methyltransferasen sowie der Histon-Deacetylasen konnte die Caveolin-1-Transkription teilweise wiederhergestellt werden. Diese Befunde lassen auf die Existenz eines DNA-Methylierungs-abhängigen Stilllegungsmechanismus der Caveolin-Genexpression durch ER α schließen. Dagegen führte die Überexpression des ER β -Subtyps in SK-N-MC-Zellen zu keiner Veränderung der Caveolin-1/-2-Expression. Interessanterweise wurde die supprimierende Wirkung des ER α durch die gleichzeitige Überexpression des ER β vollständig aufgehoben.

Der mitogene Wachstumsfaktor TGF α wurde als zweites extrazelluläres Signalmolekül identifiziert, welches eine Reduktion der Caveolin-1/-2-Genexpression bewirkt. In primären kortikalen Astrozyten konnte gezeigt werden, daß TGF α seine supprimierende Wirkung auf die Caveolin-1-Expression partiell über die Aktivierung des PI3-Kinase-abhängigen Signalweges vermittelt. Zudem wurde die supprimierende Wirkung von TGF α durch einen Inhibitor der Histon-Deacetylasen relativiert. Daher scheinen sowohl für den ER α als auch

für TGF α epigenetische Prozesse bei der Suppression der Caveolin-1-Genexpression eine entscheidende Rolle zu spielen.

Intrazellulär wirkte neben der PI3-Kinase auch der Botenstoff cAMP in kortikalen Astrozyten als Suppressor der Caveolin-Genexpression. Es wäre denkbar, daß die Caveolin-Suppression funktioneller Bestandteil des seit langem etablierten Effekts der cAMP-induzierten Astrozyten-Differenzierung ist. Desweiteren wiesen der cAMP- und TGF α -abhängige Signalweg ein überlappendes, Gehirnregion-spezifisches Regulationsprofil der Caveolin-Expression in Astrozyten auf: während in Kortex und Striatum eine Regulation durch cAMP und TGF α erfolgte, blieb diese in Klein- und Zwischenhirn aus.

Somit bewirken drei zentrale regulatorische Faktoren der Proliferation und Differenzierung neuraler Zellen eine Reduktion in der Konzentration der pleiotrop funktionellen Caveoline. Zukünftige Studien müssen zeigen, inwieweit die reduzierte Caveolin-Expression für die morphologischen und biochemischen Primärwirkungen dieser Faktoren während der Entwicklung und im Zuge der Tumorgenese mitverantwortlich ist. Außerdem könnten über die Beobachtungen der zellbiologischen Auswirkungen reduzierter Caveolin-Spiegel neue Erkenntnisse über die Funktion dieser Proteine gewonnen werden.

Summary

Caveolae represent membrane microdomains acting as integrators of cellular signaling and functional processes. Caveolin proteins are the main structural constituents of caveolae and are encoded by three homologous genes (Caveolin-1,-2,-3). The caveolins directly regulate the activity of caveolae-associated proteins such as membrane receptors and signaling molecules. The diverse effects of caveolins are dynamic as they can be modulated by a number of stimuli, including those that result in alterations of caveolin gene expression levels. In this study, several different regulatory factors have been identified which control caveolin gene expression in neural systems. These include the steroid hormone estrogen and its receptors (ERs), the growth hormone TGF α and the second messenger cAMP.

In the central nervous system, oestrogen acts as a neurotrophic factor through activation of oestrogen receptors (ERs). This study demonstrates for the first time that stable recombinant expression of the ER α subtype in neuroblastoma cells (SK-N-MC) leads to the inhibition of caveolin-1/-2 transcription as well as caveolin biosynthesis. Molecular analysis of the caveolin-1 gene revealed that silencing of caveolin-1 expression is accompanied by methylation of certain CpG dinucleotides within the promoter region. Inhibition of nuclear DNA-methyltransferases, as well as histone deacetylases resulted in a partial reactivation of caveolin-1 transcription. These results infer the existence of an epigenetic silencing mechanism involving DNA methylation. In contrast, ectopic expression of ER β subtype did not alter caveolin expression levels in SK-N-MC cells. However, when co-expressed with ER α , the ER β subtype blocked the inhibitory effects of ER α .

The glial mitogen TGF α has been identified as a second extracellular signaling molecule which suppresses caveolin gene expression. In primary astrocytes initiated from the rat cerebral cortex, TGF α -mediated caveolin suppression was observed to be partially due to the activation of the PI3-kinase dependent pathway. Moreover, an inhibitor of histone deacetylases reversed the repressive effects of TGF α . Therefore, epigenetic processes seem to be involved for both ER α and TGF α induced down-regulation of caveolin-1 expression.

Apart from the PI3-kinase, intracellular cAMP acts as suppressor of caveolin expression in primary cortical astrocytes. Therefore, we have postulated that downregulation of caveolin might underly the well characterized differentiative effects of cAMP on astrocytes *in vitro*. Interestingly, activation of either cAMP or TGF α -dependent pathways resulted in a common, brain region-specific gene regulation pattern with respect to caveolin expression: while cAMP and TGF α exerted an effect in cortical and striatal astrocytes, these molecules failed to negatively regulate caveolin in astrocytes derived from cerebellum and midbrain.

Taken together, several regulatory factors controlling proliferation and differentiation of neural cells have been identified which cause the reduction of caveolin-1 and caveolin-2 levels in neural system. Future studies have to clarify whether reduced caveolin levels are at least partially responsible for the morphological as well as biochemical primary effects of these factors. Furthermore, observations of the cellular consequences of caveolin down-regulation could provide new insights about the function of caveolins in neural cellular models.

6 Referenzen

- Alland L, Muhle R, Hou H, Jr., Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N, DePinho RA. 1997. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387**(6628):49-55.
- Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker MG, Truss M, Beato M, Sica V, Bresciani F, Weisz A. 1996. 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* **12**(11):2315-24.
- Anciaux K, Van Dommelen K, Nicolai S, Van Mechelen E, Slegers H. 1997. Cyclic AMP-mediated induction of the glial fibrillary acidic protein is independent of protein kinase A activation in rat C6 glioma. *J Neurosci Res* **48**(4):324-33.
- Antequera F, Bird A. 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24):11995-9.
- Arai Y, Sekine Y, Murakami S. 1996. Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. *Neurosci Res* **25**(4):403-7.
- Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Varakis J. 1998. Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytic tumors? *Clin Neuropathol* **17**(1):27-34.
- Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RG, Xu S, Krieger M. 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem* **272**(20):13242-9.
- Bagnoli M, Tomassetti A, Figini M, Flati S, Dolo V, Canevari S, Miotti S. 2000. Downmodulation of caveolin-1 expression in human ovarian carcinoma is directly related to alpha-folate receptor overexpression. *Oncogene* **19**(41):4754-63.

- Bakin AV, Curran T. 1999. Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science* **283**(5400):387-90.
- Barrett TJ, Spelsberg TC. 1998. Steroid receptors at the nexus of transcriptional regulation. *J Cell Biochem Suppl* **30/31**: 185-193
- Barresi V, Condorelli DF, Giuffrida Stella AM. 1999. GFAP gene methylation in different neural cell types from rat brain. *Int J Dev Neurosci* **17**(8):821-8.
- Becker JB. 1999. Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* **64**(4):803-12.
- Behl C. 2002a. Estrogen can protect neurons: modes of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* **83**(1-5):195-7.
- Behl C. 2002b. Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat Rev Neurosc* **3** (6): 433-442
- Bestor TH. 1988. Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene* **74**(1):9-12.
- Beyer C. 1999. Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol (Berl)* **199**(5):379-90.
- Beyer C, Pawlak J, Karolczak M. 2003. Membrane receptors for oestrogen in the brain. *J Neurochem* **87**(3):545-50.
- Bieche I, Parfait B, Le Doussal V, Olivi M, Rio MC, Lidereau R, Vidaud M. 2001. Identification of CGA as a novel estrogen receptor-responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. *Cancer Res* **61**(4):1652-8.
- Bilderback TR, Gazula VR, Lisanti MP, Dobrowsky RT. 1999. Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* **274**(1):257-63.
- Braun JE, Madison DV. 2000. A novel SNAP25-caveolin complex correlates with the onset of persistent synaptic potentiation. *J Neurosci* **20**(16):5997-6006.

- Bridoux AM, Fages C, Couchie D, Nunez J, Tardy M. 1986. Protein synthesis in astrocytes: 'spontaneous' and cyclic AMP-induced differentiation. *Dev Neurosci* **8**(1):31-43.
- Brown DA, London E. 1997. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun* **240**(1):1-7.
- Brown DA, Rose JK. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**(3):533-44.
- Bu J, Bruckner SR, Sengoku T, Geddes JW, Estus S. 2003. Glutamate regulates caveolin expression in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **72**(2):185-90.
- Burgueno J, Enrich C, Canela EI, Mallol J, Lluís C, Franco R, Ciruela F. 2003. Metabotropic glutamate type 1alpha receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. *J Neurochem* **86**(4):785-91.
- Butchbach ME, Tian G, Guo H, Lin CL. 2004. Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for EAAT localization and function. *J Biol Chem*.
- Cameron PL, Ruffin JW, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS. 1997. Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci* **17**(24):9520-35.
- Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. 1997a. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* **272**(10):6525-33.
- Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. 1997b. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* **272**(48):30429-38.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D. 1996. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* **16**(8):2649-58.

- De Strooper B, Annaert W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* **113** (Pt 11):1857-70.
- Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. 1995. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* **270**(12):6838-42.
- Donaghue C, Westley BR, May FE. 1999. Selective promoter usage of the human estrogen receptor-alpha gene and its regulation by estrogen. *Mol Endocrinol* **13**(11):1934-50.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC and others. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**(5539):2449-52.
- Dryden GL, Anderson JN. 1977. Ovarian hormone: lack of effect on reproductive structures of female Asian musk shrews. *Science* **197**(4305):782-4.
- Eddleston M, Mucke L. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* **54**(1):15-36.
- Ehrlich M. 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**(35):5400-13.
- Ehrlich M, Wang RY. 1981. 5-Methylcytosine in eukaryotic DNA. *Science* **212**(4501):1350-7.
- Engelman JA, Chu C, Lin A, Jo H, Ikezu T, Okamoto T, Kohtz DS, Lisanti MP. 1998a. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett* **428**(3):205-11.
- Engelman JA, Zhang XL, Galbiati F, Lisanti MP. 1998b. Chromosomal localization, genomic organization, and developmental expression of the murine caveolin gene family (Cav-1, -2, and -3). Cav-1 and Cav-2 genes map to a known tumor suppressor locus (6-A2/7q31). *FEBS Lett* **429**(3):330-6.

- Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. 1999a. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett* **448**(2-3):221-30.
- Engelman JA, Zhang XL, Razani B, Pestell RG, Lisanti MP. 1999b. p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity. *J Biol Chem* **274**(45):32333-41.
- Esteller M. 2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**(35):5427-40.
- Faber-Elman A, Solomon A, Abraham JA, Marikovsky M, Schwartz M. 1996. Involvement of wound-associated factors in rat brain astrocyte migratory response to axonal injury: in vitro simulation. *J Clin Invest* **97**(1):162-71.
- Ferreira A, Caceres A. 1991. Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *J Neurosci* **11**(2):392-400.
- Fielding CJ, Bist A, Fielding PE. 1999. Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts. *Biochemistry* **38**(8):2506-13.
- Figiel M, Maucher T, Rozyczka J, Bayatti N, Engele J. 2003. Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors. *Exp Neurol* **183**(1):124-35.
- Fitzpatrick JL, Mize AL, Wade CB, Harris JA, Shapiro RA, Dorsa DM. 2002. Estrogen-mediated neuroprotection against beta-amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor alpha or beta and activation of the MAPK pathway. *J Neurochem* **82**(3):674-82.
- Fra AM, Masserini M, Palestini P, Sonnino S, Simons K. 1995a. A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Lett* **375**(1-2):11-4.

- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. 1995b. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19):8655-9.
- Franke B, Figiel M, Engele J. 1998. CNS glia are targets for GDNF and neurturin. *Histochem Cell Biol* **110**(6):595-601.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5):1827-31.
- Futamura M, Monden Y, Okabe T, Fujita-Yoshigaki J, Yokoyama S, Nishimura S. 1995. Trichostatin A inhibits both ras-induced neurite outgrowth of PC12 cells and morphological transformation of NIH3T3 cells. *Oncogene* **10**(6):1119-23.
- Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, Lisanti MP. 1998a. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *Embo J* **17**(22):6633-48.
- Galbiati F, Volonte D, Gil O, Zanazzi G, Salzer JL, Sargiacomo M, Scherer PE, Engelman JA, Schlegel A, Parenti M and others. 1998b. Expression of caveolin-1 and -2 in differentiating PC12 cells and dorsal root ganglion neurons: caveolin-2 is up-regulated in response to cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17):10257-62.
- Galbiati F, Volonte D, Brown AM, Weinstein DE, Ben-Ze'ev A, Pestell RG, Lisanti MP. 2000. Caveolin-1 expression inhibits Wnt/beta-catenin/Lef-1 signaling by recruiting beta-catenin to caveolae membrane domains. *J Biol Chem* **275**(30):23368-77.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**(2):261-82.
- Gaudreault SB, Dea D, Poirier J. 2004. Increased caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* **25**(6):753-9.

- Ge S, Pachter JS. 2004. Caveolin-1 knockdown by small interfering RNA suppresses responses to the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 by human astrocytes. *J Biol Chem* **279**(8):6688-95.
- Gegelashvili G, Schousboe A. 1998. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull* **45**(3):233-8.
- Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Chen Y, Mazumdar M, Heale JT, Schmiesing JA, Kim W, Yokomori K, Zhao Y and others. 2004. Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery. *Nucleic Acids Res* **32**(9):2716-29.
- Glenney JR, Jr. 1992. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett* **314**(1):45-8.
- Glenney JR, Jr., Soppet D. 1992. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21):10517-21.
- Goldman JE, Abramson B. 1990. Cyclic AMP-induced shape changes of astrocytes are accompanied by rapid depolymerization of actin. *Brain Res* **528**(2):189-96.
- Goldman JE, Chiu FC. 1984. Dibutyryl cyclic AMP causes intermediate filament accumulation and actin reorganization in astrocytes. *Brain Res* **306**(1-2):85-95.
- Gorski RA, Harlan RE, Jacobson CD, Shryne JE, Southam AM. 1980. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J Comp Neurol* **193**(2):529-39.
- Gorski RA, Wagner JW. 1965. Gonadal Activity and Sexual Differentiation of the Hypothalamus. *Endocrinology* **76**:226-39.
- Goto K, Numata M, Komura JI, Ono T, Bestor TH, Kondo H. 1994. Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation* **56**(1-2):39-44.

- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* **10**(4):1286-91.
- Goulding EH, Ngai J, Kramer RH, Colicos S, Axel R, Siegelbaum SA, Chess A. 1992. Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons. *Neuron* **8**(1):45-58.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**(6058):134-9.
- Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, Ferno M, Peterson C, Meltzer PS. 2001. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* **61**(16):5979-84.
- Hall JM, Chang CY, McDonnell DP. 2000. Development of peptide antagonists that target estrogen receptor beta-coactivator interactions. *Mol Endocrinol* **14**(12):2010-23.
- Hall JM, McDonnell DP. 1999. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* **140**(12):5566-78.
- Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, Halachmi S, Liu H, Searcy B, Kurokawa R, Brown M. 1996. p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21):11540-5.
- Harlan RE. 1988. Regulation of neuropeptide gene expression by steroid hormones. *Mol Neurobiol* **2**(3):183-200.
- Hata K, Sakaki Y. 1997. Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene* **189**(2):227-34.
- Hattori M, Kuhara S, Takenaka O, Sakaki Y. 1986. L1 family of repetitive DNA sequences in primates may be derived from a sequence encoding a reverse transcriptase-related protein. *Nature* **321**(6070):625-8.

- Hendrich B, Bird A. 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18**(11):6538-47.
- Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **141**(1):85-99.
- Hilakivi-Clarke L, Cabanes A, Olivo S, Kerr L, Bouker KB, Clarke R. 2002. Do estrogens always increase breast cancer risk? *J Steroid Biochem Mol Biol* **80**(2):163-74.
- Hurlstone AF, Reid G, Reeves JR, Fraser J, Strathdee G, Rahilly M, Parkinson EK, Black DM. 1999. Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. *Oncogene* **18**(10):1881-90.
- Ikezu T, Trapp BD, Song KS, Schlegel A, Lisanti MP, Okamoto T. 1998a. Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **273**(17):10485-95.
- Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H and others. 1998b. Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res* **804**(2):177-92.
- Ivanova T, Mendez P, Garcia-Segura LM, Beyer C. 2002. Rapid stimulation of the PI3-kinase/Akt signalling pathway in developing midbrain neurones by oestrogen. *J Neuroendocrinol* **14**(1):73-9.
- Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. 1997. The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* **11**(6):693-705.
- Jacobson CD, Davis FC, Gorski RA. 1985. Formation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area: neuronal growth, migration and changes in cell number. *Brain Res* **353**(1):7-18.

- Jacobson CD, Gorski RA. 1981. Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. *J Comp Neurol* **196**(3):519-29.
- Jenkins R, Takahashi S, DeLacey K, Bergstralh E, Lieber M. 1998. Prognostic significance of allelic imbalance of chromosome arms 7q, 8p, 16q, and 18q in stage T3N0M0 prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **21**(2):131-43.
- Jodoin J, Demeule M, Fenart L, Cecchelli R, Farmer S, Linton KJ, Higgins CF, Beliveau R. 2003. P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins. *J Neurochem* **87**(4):1010-23.
- Junier MP. 2000. What role(s) for TGFalpha in the central nervous system? *Prog Neurobiol* **62**(5):443-73.
- Junier MP, Couplier M, Le Forestier N, Cadusseau J, Suzuki F, Peschanski M, Dreyfus PA. 1994. Transforming growth factor alpha (TGF alpha) expression in degenerating motoneurons of the murine mutant wobbler: a neuronal signal for astrogliosis? *J Neurosci* **14**(7):4206-16.
- Jurgens B, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. 1996. Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma. *Cancer Res* **56**(24):5698-703.
- Kamiya K, Sato T, Nishimura N, Goto Y, Kano K, Iguchi T. 1996. Expression of estrogen receptor and proto-oncogene messenger ribonucleic acids in reproductive tracts of neonatally diethylstilbestrol-exposed female mice with or without post-puberal estrogen administration. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104**(2):111-22.
- Karpf AR, Jones DA. 2002. Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene* **21**(35):5496-503.
- Kaser MR, Lakshmanan J, Fisher DA. 1992. Comparison between epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and EGF receptor levels in regions of adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **16**(3-4):316-22.

- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**(5397):2275-9.
- Kenworthy A. 2002. Peering inside lipid rafts and caveolae. *Trends Biochem Sci* **27**(9):435-7.
- Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I. 1999. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* **263**(1):257-62.
- Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC. 1988. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res* **16**(2):647-63.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**(3):863-70.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12):5925-30.
- Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K. 1992. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* **118**(5):1003-14.
- Lamb J, Ladha MH, McMahon C, Sutherland RL, Ewen ME. 2000. Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* **20**(23):8667-75.
- Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J and others. 1998. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6):2920-5.

- Lee DC, Fenton SE, Berkowitz EA, Hissong MA. 1995. Transforming growth factor alpha: expression, regulation, and biological activities. *Pharmacol Rev* **47**(1):51-85.
- Leung BS. 1987. Mode of estrogen action on cell proliferation in CAMA-1 cells: III. Effect of antiestrogen. *Anticancer Res* **7**(2):219-25.
- Leutz A, Schachner M. 1981. Epidermal growth factor stimulates DNA-synthesis of astrocytes in primary cerebellar cultures. *Cell Tissue Res* **220**(2):393-404.
- Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. 1998. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* **58**(15):3197-201.
- Li S, Couet J, Lisanti MP. 1996. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* **271**(46):29182-90.
- Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* **270**(26):15693-701.
- Lisanti MP, Sargiacomo M, Scherer PE. 1999. Purification of caveolae-derived membrane microdomains containing lipid-anchored signaling molecules, such as GPI-anchored proteins, H-Ras, Src-family tyrosine kinases, eNOS, and G-protein alpha-, beta-, and gamma-subunits. *Methods Mol Biol* **116**:51-60.
- Liu J, Lee P, Galbiati F, Kitsis RN, Lisanti MP. 2001a. Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(4):C823-35.
- Liu Z, Kokunai T, Tamaki N. 2001b. Tamoxifen interacts with NEU/C-ERBB-2 receptor and inhibits growth of human malignant glioma cell lines. *Kobe J Med Sci* **47**(3):131-40.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* **25** (4):402-8.

- Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T. 2003. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* **4**(6):499-515.
- Lustig RH, Sudol M, Pfaff DW, Federoff HJ. 1991. Estrogenic regulation and sex dimorphism of growth-associated protein 43 kDa (GAP-43) messenger RNA in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* **11**(2):125-32.
- Manolagas SC, Kousteni S. 2001. Perspective: nonreproductive sites of action of reproductive hormones. *Endocrinology* **142**(6):2200-4.
- Manthey D, Heck S, Engert S, Behl C. 2001. Estrogen induces a rapid secretion of amyloid beta precursor protein via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Biochem* **268**(15):4285-91.
- Martin V, Ribieras S, Song-Wang XG, Lasne Y, Frappart L, Rio MC, Dante R. 1997. Involvement of DNA methylation in the control of the expression of an estrogen-induced breast-cancer-associated protein (pS2) in human breast cancers. *J Cell Biochem* **65**(1):95-106.
- Mattson MP. 2003. Methylation and acetylation in nervous system development and neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev* **2**(3):329-42.
- Mazumdar A, Wang RA, Mishra SK, Adam L, Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Vadlamudi RK, Kumar R. 2001. Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nat Cell Biol* **3**(1):30-7.
- McClelland M, Ivarie R. 1982. Asymmetrical distribution of CpG in an 'average' mammalian gene. *Nucleic Acids Res* **10**(23):7865-77.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* **20**(3):321-44.
- McLachlan JA, Burow M, Chiang TC, Li SF. 2001. Gene imprinting in developmental toxicology: a possible interface between physiology and pathology. *Toxicol Lett* **120**(1-3):161-4.

- Melmed S. 2003. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest* **112**(11):1603-18.
- Mikol DD, Hong HL, Cheng HL, Feldman EL. 1999. Caveolin-1 expression in Schwann cells. *Glia* **27**(1):39-52.
- Miller S, Romano C, Cotman CW. 1995. Growth factor upregulation of a phosphoinositide-coupled metabotropic glutamate receptor in cortical astrocytes. *J Neurosci* **15**(9):6103-9.
- Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA and others. 1998. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* **18**(4):365-8.
- Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H. 2001. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* **97**(5):1172-9.
- Moggs JG, Orphanides G. 2001. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep* **2**(9):775-81.
- Moghal N, Sternberg PW. 1999. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol* **11**(2):190-6.
- Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV. 1995. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* **6**(7):911-27.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* **392**(1):49-53.
- Mueller H, Liu R, David F, Eppenberger U. 1997. Selective modulation of protein kinase A and protein kinase C activities in epidermal growth factor (EGF)-stimulated MCF-7 breast cancer cells. *Biol Chem* **378**(9):1023-9.

- Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22):10339-43.
- Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG. 1987. Estrogen induction of N-myc and c-myc proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endocrinology* **120**(5):1882-8.
- Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM. 1997. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**(3):373-80.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**(6683):386-9.
- Ng HH, Bird A. 1999. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* **9**(2):158-63.
- Nichols B. 2003. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* **116**(Pt 23):4707-14.
- Nishiyama K, Trapp BD, Ikezu T, Ransohoff RM, Tomita T, Iwatsubo T, Kanazawa I, Hsiao KK, Lisanti MP, Okamoto T. 1999. Caveolin-3 upregulation activates beta-secretase mediated cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **19**(15):6538-48.
- Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE. 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* **141**(1):101-14.
- Okano M, Xie S, Li E. 1998. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* **19**(3):219-20.
- Park WY, Park JS, Cho KA, Kim DI, Ko YG, Seo JS, Park SC. 2000. Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *J Biol Chem* **275**(27):20847-52.

- Parolini I, Sargiacomo M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelman JA, Okamoto T, Ikezu T, Scherer PE, Mora R and others. 1999. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J Biol Chem* **274**(36):25718-25.
- Parpal S, Karlsson M, Thorn H, Stralfors P. 2001. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J Biol Chem* **276**(13):9670-8.
- Parton RG, Joggerst B, Simons K. 1994. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **127**(5):1199-215.
- Peiro S, Comella JX, Enrich C, Martin-Zanca D, Rocamora N. 2000. PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation. *J Biol Chem* **275**(48):37846-52.
- Pelkmans L, Helenius A. 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic* **3**(5):311-20.
- Pelligrino DA, Ye S, Tan F, Santizo RA, Feinstein DL, Wang Q. 2000. Nitric-oxide-dependent pial arteriolar dilation in the female rat: effects of chronic estrogen depletion and repletion. *Biochem Biophys Res Commun* **269**(1):165-71.
- Persengiev SP, Kilpatrick DL. 1996. Nerve growth factor induced differentiation of neuronal cells requires gene methylation. *Neuroreport* **8**(1):227-31.
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN and others. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**(5392):1281-4.
- Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA. 2000. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* **19**(43):4970-8.
- Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE. 2000. A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**(5):261-8.

- Pike CJ. 1999. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* **72**(4):1552-63.
- Planas-Silva MD, Weinberg RA. 1997. Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution. *Mol Cell Biol* **17**(7):4059-69.
- Praefcke GJ, McMahon HT. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(2):133-47.
- Prak ET, Kazazian HH, Jr. 2000. Mobile elements and the human genome. *Nat Rev Genet* **1**(2):134-44.
- Probstmeier R, Schachner M. 1986. Epidermal growth factor is not detectable in developing and adult rodent brain by a sensitive double-site enzyme immunoassay. *Neurosci Lett* **63**(3):290-4.
- Rabchevsky AG, Weinitz JM, Couplier M, Fages C, Tinel M, Junier MP. 1998. A role for transforming growth factor alpha as an inducer of astrogliosis. *J Neurosci* **18**(24):10541-52.
- Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER. 2002. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* **16**(1):100-15.
- Razani B, Lisanti MP. 2001. Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(4):C1241-50.
- Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG and others. 2001a. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* **276**(41):38121-38.
- Razani B, Schlegel A, Liu J, Lisanti MP. 2001b. Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 4):494-9.

- Razani B, Schlegel A, Lisanti MP. 2000. Caveolin proteins in signaling, oncogenic transformation and muscular dystrophy. *J Cell Sci* **113** (Pt 12):2103-9.
- Razani B, Rubin CS, Lisanti MP. 1999. Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem* **274**(37):26353-60.
- Reddy VV, Naftolin F, Ryan KJ. 1974. Conversion of androstenedione to estrone by neural tissues from fetal and neonatal rats. *Endocrinology* **94**(1):117-21.
- Reese JC, Katzenellenbogen BS. 1992. Examination of the DNA-binding ability of estrogen receptor in whole cells: implications for hormone-independent transactivation and the actions of antiestrogens. *Mol Cell Biol* **12**(10):4531-8.
- Reisert I, Han V, Lieth E, Toran-Allerand D, Pilgrim C, Lauder J. 1987. Sex steroids promote neurite growth in mesencephalic tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in vitro. *Int J Dev Neurosci* **5**(2):91-8.
- Roberts M, Wallace J, Jeltsch JM, Berry M. 1988. The 5' flanking region of the human pS2 gene mediates its transcriptional activation by estrogen in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **151**(1):306-13.
- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. 1999. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* **27**(11):2291-8.
- Robertson KD, Wolffe AP. 2000. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* **1**(1):11-9.
- Ronaldson PT, Bendayan M, Gingras D, Piquette-Miller M, Bendayan R. 2004. Cellular localization and functional expression of P-glycoprotein in rat astrocyte cultures. *J Neurochem* **89**(3):788-800.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**(4):673-82.

- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncel RW. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13**(3):713-25.
- Russo J, Ao X, Grill C, Russo IH. 1999. Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat* **53**(3):217-27.
- Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson JA. 2000. Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(1):337-42.
- Santagati S, Melcangi RC, Celotti F, Martini L, Maggi A. 1994. Estrogen receptor is expressed in different types of glial cells in culture. *J Neurochem* **63**(6):2058-64.
- Santourlidis S, Florl A, Ackermann R, Wirtz HC, Schulz WA. 1999. High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate. *Prostate* **39**(3):166-74.
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. 1995. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20):9407-11.
- Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP. 1997. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* **272**(46):29337-46.
- Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1):131-5.
- Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP. 1999. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha. *J Biol Chem* **274**(47):33551-6.

- Schlegel A, Wang C, Pestell RG, Lisanti MP. 2001. Ligand-independent activation of oestrogen receptor alpha by caveolin-1. *Biochem J* **359**(Pt 1):203-10.
- Schluter K, Figiel M, Rozyczka J, Engele J. 2002. CNS region-specific regulation of glial glutamate transporter expression. *Eur J Neurosci* **16**(5):836-42.
- Scoville SA, Bufton SM, Liuzzi FJ. 1997. Estrogen regulates neurofilament gene expression in adult female rat dorsal root ganglion neurons. *Exp Neurol* **146**(2):596-9.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**(6):843-52.
- Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB, Anderson E, Hewlett J, Davies MP, Sibson DR, Sloane JP. 1999. Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. *Am J Pathol* **155**(6):1811-5.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **388**(4):507-25.
- Shupnik MA, Pitt LK, Soh AY, Anderson A, Lopes MB, Laws ER, Jr. 1998. Selective expression of estrogen receptor alpha and beta isoforms in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **83**(11):3965-72.
- Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. 1998. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport* **9**(11):2565-8.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* **19**(11):7289-304.
- Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RG. 1994. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol* **127**(5):1185-97.
- Smit AF. 1999. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* **9**(6):657-63.

- Sohrabji F, Greene LA, Miranda RC, Toran-Allerand CD. 1994. Reciprocal regulation of estrogen and NGF receptors by their ligands in PC12 cells. *J Neurobiol* **25**(8):974-88.
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ and others. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**(6647):194-8.
- Stahlhut M, van Deurs B. 2000. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **11**(1):325-37.
- Sun FL, Elgin SC. 1999. Putting boundaries on silence. *Cell* **99**(5):459-62.
- Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC. 1997. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* **17**(3):932-40.
- Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T. 2000. Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Jpn J Clin Oncol* **30**(7):306-9.
- Tang Z, Okamoto T, Boontrakulpoontawee P, Katada T, Otsuka AJ, Lisanti MP. 1997. Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Implications for the molecular evolution of mammalian caveolin genes. *J Biol Chem* **272**(4):2437-45.
- Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* **271**(4):2255-61.
- Teixeira A, Chaverot N, Schroder C, Strosberg AD, Couraud PO, Cazaubon S. 1999. Requirement of caveolae microdomains in extracellular signal-regulated kinase and focal adhesion kinase activation induced by endothelin-1 in primary astrocytes. *J Neurochem* **72**(1):120-8.

- Toran-Allerand CD, Singh M, Setalo G, Jr. 1999. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol* **20**(2):97-121.
- Toya Y, Schwencke C, Couet J, Lisanti MP, Ishikawa Y. 1998. Inhibition of adenylyl cyclase by caveolin peptides. *Endocrinology* **139**(4):2025-31.
- Turi A, Kiss AL, Mullner N. 2001. Estrogen downregulates the number of caveolae and the level of caveolin in uterine smooth muscle. *Cell Biol Int* **25**(8):785-94.
- Uittenbogaard A, Smart EJ. 2000. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem* **275**(33):25595-9.
- Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ. 1998. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem* **273**(11):6525-32.
- van Deurs B, Roepstorff K, Hommelgaard AM, Sandvig K. 2003. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol* **13**(2):92-100.
- Vassar R, Citron M. 2000. Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron* **27**(3):419-22.
- Walker BE, Kurth LA. 1993. Pituitary tumors in mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Cancer Res* **53**(7):1546-9.
- Wang SL, Shiverick KT, Ogilvie S, Dunn WA, Raizada MK. 1989. Characterization of epidermal growth factor receptors in astrocytic glial and neuronal cells in primary culture. *Endocrinology* **124**(1):240-7.
- Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, Zhumabayeva B, Siebert PD, Dietel M, Schafer R and others. 2001. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* **159**(5):1635-43.
- Williams TM, Lisanti MP. 2004. The caveolin proteins. *Genome Biol* **5**(3):214.

- Woodcock DM, Lawler CB, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD. 1997. Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J Biol Chem* **272**(12):7810-6.
- Yamada E. 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* **1**(5):445-58.
- Yu X, Rajala RV, McGinnis JF, Li F, Anderson RE, Yan X, Li S, Elias RV, Knapp RR, Zhou X and others. 2004. Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *J Biol Chem* **279**(13):13086-94.
- Zelenaia O, Schlag BD, Gochenauer GE, Ganel R, Song W, Beesley JS, Grinspan JB, Rothstein JD, Robinson MB. 2000. Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Pharmacol* **57**(4):667-78.
- Zenklusen JC, Bieche I, Lidereau R, Conti CJ. 1994a. (C-A)_n microsatellite repeat D7S522 is the most commonly deleted region in human primary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25):12155-8.
- Zenklusen JC, Thompson JC, Troncoso P, Kagan J, Conti CJ. 1994b. Loss of heterozygosity in human primary prostate carcinomas: a possible tumor suppressor gene at 7q31.1. *Cancer Res* **54**(24):6370-3.
- Zschocke J, Manthey D, Bayatti N, van der Burg B, Goodenough S, Behl C. 2002. Estrogen receptor alpha-mediated silencing of caveolin gene expression in neuronal cells. *J Biol Chem* **277**(41):38772-80.
- Zschocke J, Manthey D, Bayatti N, Behl C. 2003. Functional interaction of estrogen receptor alpha and caveolin isoforms in neuronal SK-N-MC cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**(2-3):167-70.

Zschocke J, Bayatti N, Behl C. 2004. Caveolin and GLT-1 gene expression is reciprocally regulated in primary astrocytes: association of GLT-1 with non-caveolar lipid rafts. *Glia*, **in press**

Zundel W, Swiersz LM, Giaccia A. 2000. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* **20**(5):1507-14.

-884	AACATTTTGT	GTATTTTGCA	AATATGGCAT	AACCTGTTGG	CATAAAATTC	CATTGTTCCA
-824	GAAAATAT ¹ CG	GTAATAAAAT	TATAGAAAAG	TTAAAGATCT	TCATTTCTTA	TT ² CGA ³ AGCG
						<i>Taq</i> I
-764	TTTGGGAGAC	ATTTAGAAA	⁴ CGGATGGGAA	ATGTTAAATT	CTGCATGCCT	GCTTAAGTTT
-704	CCATCCACAC	⁵ CGACTAGATG	TAAA ⁶ CGAGTG	TCACCAAAG	TACACCACAG	GCACCCACAC
-644	AGATTCCTTC	CATAAG	<u>GGAT CC</u> ACAAAGTT	TAGATGTGAA	ATGTACCTAA	AGGTTCCTAG
			<i>Bam</i> HI			
-584	⁷ CGTCTTTCA	TCCCTCCCTC	TGTGAAACAG	GGAGACACAT	GTGTTTTAAG	GCAGAGATGG

DNA-Bisulfit-Behandlung

PCR

Bam HI/*Taq* I-Restriktionsverdau



	Sense Primer Cav1prom-1s					
-884	AATATTTTGT	GTATTTTGTA	AATATGGTAT	AATTTGTTGG	TATAAAATTT	TATTGTTTTA
-824	GAAAATAT ¹ NG	GTAATAAAAT	TATAGAAAAG	TTAAAGATTT	TTATTTTTTA	TT ² NGA ³ AGNG
						<i>Taq</i> I
-764	TTTGGGAGAT	ATTTTAGAAA	⁴ NGGATGGGAA	ATGTTAAATT	TTGTATGTTT	GTTTAAGTTT
-704	TTATTTATAT	⁵ TNGA ⁶ TTAGATG	TAAA ⁶ NGAGTG	TTATTAAAAG	TATATTATAG	GTATTTATAT
		<i>Taq</i> I				
-644	AGATTTTTTTT	TATAAG	<u>GGAT</u> TTATAAAGTT	TAGATGTGAA	ATGTATTTAA	AGGTTTTTATAG
			<i>Bam</i> HI			
-584	⁷ TNGTTTTTTTA	TTTTTTTTTTT	TGTGAAATAG	GGAGATATAT	<u>GTGTTTTAAG</u>	GTAGAGATGG
					Antisense Primer Cav1prom-1as	

Anhang. Sequenz der Caveolin-1-Promoter-Region A vor und nach Bisulfit-Konversion. Gezeigt ist die DNA-Sequenz der Promoter-Region A (oberer Kasten). Die Region weist 7 CpG-Dinukleotide auf (rot). Diagnostische Restriktionsschnittstellen für *Taq* I und *Bam* HI sind hervorgehoben. Die Nukleotid-Positionen beziehen sich auf das ATG-Startkodon des Caveolin-1-Gens. Nach Bisulfit-Modifikation erfolgt die Umwandlung der Cytosin- in Thyminreste (unterer Kasten). N innerhalb der CpG-Dinukleotide bezeichnet das Vorkommen von entweder Cytosin- oder Thyminresten. Die Primeranlagerungsstellen für die Amplifikation und anschließende Sequenzierung sind unterstrichen. Die *Bam* HI-Schnittstelle wird nach erfolgreicher Konversion eliminiert.

Lebenslauf

Name: Jürgen Zschocke
Geburtsdatum: 30. Juni 1974
Geburtsort: München
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1981-1984 Grundschule an der Turnerstrasse, München
1985-1994 Ernst-Mach-Gymnasium, Haar
Juli 1994 Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife

Universitäre Ausbildung:

Nov. 1994-1996 Beginn des Studiums der Pädagogik an der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Nov. 1996-
Jan. 2001 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität mit dem Hauptfach Humangenetik und den Nebenfächern Biochemie, Pharmakologie sowie Genetik.

Apr. 2000-
Jan. 2001 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität mit dem Thema „Organisation und Expression von CTp11, einer neuen Genfamilie, die für onkotestikuläre Antigene kodiert“ unter der Leitung von Prof. E.H. Weiss.

Apr. 2001-
Sept. 2002 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, in der Nachwuchsgruppe von Prof. C. Behl, mit dem Thema „Mechanismen der Caveolin-Genregulation in neuronalen Zellsystemen“.

Okt. 2002-
Sept. 2004 Fortsetzung der Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, unter der Leitung von Prof. C. Behl.

Publikationen des Authors:

Publikationen:

Zschocke J, Bayatti N, Behl C. Caveolin and GLT-1 expression is reciprocally regulated in primary astrocytes: association of GLT-1 with non-caveolar lipid rafts. *Glia* 2004, **im Druck**.

Bayatti N, Zschocke J, Behl C. Brain region-specific neuroprotective action and signaling of corticotropin-releasing hormone in primary neurons. *Endocrinology*. 2003 Sep; **144**(9): 4051-60.

Zendman AJ, Zschocke J, van Kraats AA, de Wit NJ, Kurpisz M, Weidle UH, Ruitter DJ, Weiss EH, van Muijen GN. The human SPANX multigene family: genomic organization, alignment and expression in male germ cells and tumor cell lines. *Gene*. 2003 May 8; **309**(2): 125-33.

Zschocke J, Manthey D, Bayatti N, Behl C. Functional interaction of estrogen receptor alpha and caveolin isoforms in neuronal SK-N-MC cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003 Feb; **84**(2-3): 167-70.

Zschocke J, Manthey D, Bayatti N, van der Burg B, Goodenough S, Behl C. Estrogen receptor alpha-mediated silencing of caveolin gene expression in neuronal cells. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11; **277**(41):38772-80.

Publizierte Abstracts:

Zschocke J, Bayatti N, Behl C. Reciprocal regulation of caveolin and GLT-1 gene expression in rat cortical astrocytes. (2004) *FENS* Abstr. 2: A179.26.

Zschocke J, Bayatti N, Behl C. Brain region-specific neuroprotective action and signaling of corticotrophin-releasing hormone in primary neurons. Program No. 709.4 (2003). Abstract Viewer and Itenary Planner. Washington, DC: **Society for Neuroscience**. Online.

Bayatti N, Zschocke J, Behl C. Signalling pathways mediating the neuroprotective effect of corticotropin-releasing hormone. (2003) *British Neurosc. Assoc.* Abstr., Vol 17, p. 131.