

**Institut für klinische Neurobiologie**

**Funktionelle Charakterisierung von Bag-1, dem Cochaperon von Hsp70,  
in der neuronalen Differenzierung und im neuronalen Überleben**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Karin Frebel

aus

Münster

Würzburg, 2007

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: Professor Dr. Stefan Wiese

Gutachter: Professor Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Meiner Schwester Kirsten

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1 Der programmierte Zelltod .....	3
1.2 Neuroneogenese .....	5
1.3 Der Einfluss von Stress auf den Hippokampus .....	6
1.4 Die Extrazelluläre Matrix .....	8
1.5 Neurotrophe Faktoren .....	9
1.5.1 Die Familie der Neurotrophine und ihre Rezeptoren .....	9
1.5.2 Signaltransduktion von Neurotrophen Faktoren .....	11
1.6 Bag-1 – ein multifunktionales Molekül .....	12
1.6.1 Die Funktion der Bag-Domäne .....	14
1.6.2 Die Funktion der Ubiquitin-ähnlichen Domäne .....	15
1.6.3 Cochaperonaktivität von Bag-1 .....	15
1.6.4 Apoptose und Stressregulierung durch Bag-1 .....	16
1.6.5 Modulation nukleärer Hormon-Rezeptoren durch Bag-1 am Beispiel des Glucocorticoid-Rezeptors .....	17
1.7 Modellsysteme .....	19
1.8 Ziel der Arbeit .....	20
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1 Material .....	21
2.1.1 Geräte .....	21
2.1.2 Chemikalien .....	21
2.1.3 Medien, Nährböden und Lösungen für Bakterienkulturen .....	21
2.1.4 Material für molekularbiologische Methoden .....	22
2.1.5 Lösungen für molekularbiologische Methoden .....	22
2.1.6 Material für biochemische Methoden .....	23
2.1.7 Lösungen für biochemische Methoden .....	24
2.1.8 Material und Lösungen für Immunhistochemie .....	26
2.1.9 Material und Lösungen für Immunzytochemie .....	27
2.1.10 Faktoren, Medien und Lösungen für die Zellkultur .....	28

2.1.11 Bakterienstämme .....	29
2.1.12 Zelllinien .....	29
2.1.13 Plasmide .....	29
2.1.14 Synthetische Oligonukleotide .....	30
2.1.15 Antikörper .....	30
2.2 Methoden .....	31
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	31
2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse .....	31
2.2.1.2 Isolierung von DNA im präparativen Maßstab .....	32
2.2.1.3 Präparation von genomischer DNA .....	32
2.2.1.4 Enzymatischer Restriktionsverdau von DNA .....	32
2.2.1.5 DNA-Gelelektrophorese .....	33
2.2.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten .....	33
2.2.1.7 Dephosphorylierung linearisierter DNA .....	33
2.2.1.8 Auffüllen von 5' DNA-Enden .....	34
2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten .....	34
2.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	34
2.2.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	34
2.2.1.12 Sequenzierung von DNA .....	36
2.2.1.13 Herstellung von kompetenten Bakterien für die Hitzeschocktransformation .....	36
2.2.1.14 Transformation durch Hitzeschock .....	37
2.2.2 Proteinbiochemie .....	38
2.2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten .....	38
2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	38
2.2.2.3 Immunpräzipitation .....	38
2.2.2.4 Western Blot ( <i>semi-dry</i> Blot) .....	39
2.2.2.5 Immundetektion von Proteinen .....	39
2.2.3 Immunhistochemie .....	40
2.2.3.1 Immunologischer Nachweis von BrdU-Inkorporation auf histologischen Schnitten .....	40
2.2.4 Tierversuche .....	41
2.2.4.1 Tierhaltung .....	41
2.2.4.2 Injektion von NaCl, BrdU und Dexamethason in Mäuse .....	41

2.2.4.3 Perfusion .....	42
2.2.5 Zellkultur .....	42
2.2.5.1 Auftauen von Zellen .....	42
2.2.5.2 Kryokonservierung von Zellen .....	42
2.2.5.3 Präparation von Neuralen Stammzellen .....	43
2.2.5.4 Calciumphosphat-vermittelte Transfektion von HEK293T Zellen .....	43
2.2.5.5 Lentivirale Transfektion .....	44
2.2.5.6 Transfektion von PC12 Zellen mit Lipofectamine® 2000.....	44
2.2.5.7 Transfektion von Neuralen Stammzellen mittels Elektroporation .....	45
2.2.5.8 Indirekte Immunfluoreszenz .....	46
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1 Funktionelle Analyse von Bag-1 in PC12 Zellen .....	48
3.1.1 Subzelluläre Lokalisation der Bag-1 Isoformen .....	50
3.1.2 Analyse der Bag-1 Isoformen in der Differenzierung von PC12 Zellen .....	51
3.1.3 Subzelluläre Analyse der Signalmoleküle B-Raf, Hsp70, Akt und MAPK .....	54
3.2 Funktionelle Analyse von Bag-1 in Neuralen Stammzellen .....	60
3.2.1 Expressionsanalyse von Bag-1 in Neuralen Stammzellen .....	60
3.2.2 Analyse von <i>Bag-1</i> <sup>-/-</sup> Neuralen Stammzellen .....	61
3.2.3 Analyse der Maus Bag-1 Isoformen in Neuralen Stammzellen .....	66
3.3 Funktionelle Analyse von Bag-1 in der Modulation des Glucocorticoid-Rezeptors in Neuralen Stammzellen .....	73
3.3.1 Analyse des Überlebens von <i>Bag-1</i> <sup>+/+</sup> Neuralen Stammzellen unter dem Einfluss von Dexamethason .....	73
3.3.2 Analyse des Überlebens von <i>Bag-1</i> <sup>-/-</sup> Neuralen Stammzellen unter dem Einfluss von Dexamethason .....	75
3.3.3 Analyse der Maus-Bag-1 Isoformen in der Modulation des Glucocorticoid- Rezeptors .....	76
3.3.4 Etablierung einer <i>in vivo</i> Methode zur Analyse des Einfluss von Glucocorticoiden auf die Neuroneogenese in adulten Mäusen .....	81
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1 Funktionelle Analyse von Bag-1 in PC12 Zellen .....	83
4.2 Funktionelle Analyse von Bag-1 in Neuralen Stammzellen .....	85
4.3 Funktionelle Analyse von Bag-1 in der Modulation des Glucocorticoid-Rezeptors in Neuralen Stammzellen .....	88

---

<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>112</b>
Erklärung .....	112
Lebenslauf .....	113
Publikationen .....	114
Danksagung .....	115

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Oktober 2003 bis Dezember 2006 am Institut für Klinische Neurobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Betreuung von Professor Dr. Stefan Wiese durchgeführt.

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AA	Aminoacid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ala (A)	Alanin
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
APS	Amoniumperoxidisulfat
Arg (R)	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
Bag	Bcl-2 anthagone
Bcl	B-Cell lymphoma
BDNF	Brain Derived Growth Factor
bFGF	Basic fibroblast growth factor
bidest.	Doppelt destilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
c	Centi
ca.	Circa
cDNA	Komplementäre DNA
CNTF	Ciliary neurotrophin factor
Da	Dalton
Dbc	Doublecortin
Dex	Dexamethason
DG	Gyrus Dentatus
DMEM	Dulbecco's modified eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
EZM	Extrazelluläre Matrix
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EK	Endkonzentration
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GFAP	Gliary fibrillaric acid protein
GFP	Green fluorescent protein
Glu	Glutaminsäure
Gln	Glutamin
GR	Glucocortioid-Rezeptor
h	Stunde(n)



HPA	Hypothalamus-pituitary-adrenal axis
Hsp	Heat shock protein
IAP	Inhibitor of apoptosis protein(s)
i. p.	Intraperitoneal
k	Kilo
l	Liter
LB	Luria Bertani
LIF	Leukemia inhibitory factor
Lsg.	Lösung
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
Map	Microtubule-associated-protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
mEGF	Murine epidermal growth factor
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute(n)
n	Nano
NF	Neurofilament
NGF	Nerve growth factor
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NT	Neurotrophin
NTR	Neurotrophin receptor
O4	Oligodendrocyte marker 4
OD	Optische Dichte
o. g.	Oben genannte(s)
P	Phospho
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphatinositol-3-kinase
Rho	Ras homolog
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodium-dodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SVZ	Subventrikuläre Zone
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	Tropomyosin-related-kinase
U	Unit (Einheit)
UBL	Ubiquitin-like domain
u. a.	Unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
VZ	Ventrikuläre Zone
WB	Western-Blot
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Zusammenfassung

*Bag-1* Defizienz in Mäusen führt in der embryonalen Entwicklung zu einem lethalen Phänotyp mit schweren Defekten in Nervensystem und Leber. Neben der Expression der Inhibitor of Apoptosis Proteinen (IAP), ist ein Komplex aus Akt, Hsp70, Bag-1 und B-Raf für die Phosphorylierung eines spezifischen AS-Restes des pro-apoptotischen Proteins Bad für das Überleben wichtig (Gotz und Wiese et al., 2005). Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Funktionen der Maus Bag-1 Isoformen in der neuronalen Entwicklung anhand von *in vitro* Modellen näher zu charakterisieren.

Überexpression von Bag-1S und Bag-1L in PC12 Zellen zeigte, dass Bag-1S im Zytoplasma und im Zellkern exprimiert wird, Bag-1L nur im Zellkern. Eine eingeführte Punktmutation, die die Interaktion mit Hsp70 verhindert, führte zu einer zytoplasmatischen Expression von Bag-1Sm. Die Mutante Bag-1Lm blieb nukleär lokalisiert. Überexpression von Bag-1S führte zu einer Reduktion der Neuritenlänge. Bag-1L und die mutanten Isoformen zeigten diesen Effekt nicht. Der inhibierende Einfluss von Bag-1S auf das Neuritenwachstum ist bislang spekulativ. Die Regulation erfolgt vermutlich über den Komplex Bag-1, Hsp70, Akt und B-Raf. Die Analyse von *Bag-1*  $-/-$  Neuralen Stammzellen zeigte im Vergleich zu *Bag-1*  $+/+$  Neuralen Stammzellen eine erhöhte Apoptose. Wurde durch Vireninfektion Bag-1S oder Bag-1L zurück in die Zellen gebracht, waren diese wieder in der Lage zu überleben. Die Mutanten zeigten diese Effekte nicht, so dass Hsp70 ein notwendiger Interaktionspartner für die überlebensfördernde Wirkung von Bag-1 ist. *Bag-1*  $-/-$  Neurale Stammzellen zeigten außerdem gliale Differenzierungsdefekte, die nicht durch eine Rückführung der Isoformen gerettet werden konnten. Zusätzliche Experimente, die Neurale Stammzellen gezielt in die gliale Differenzierung durch Gabe von CNTF oder LIF leiten, zeigten, dass *Bag-1*  $-/-$  Neurale Stammzellen durchaus in der Lage sind, gliale Zellen zu bilden. Bag-1 gilt auch als Modulator nukleärer Rezeptoren, wie dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR). Die Kotransfektion der Bag-1 Isoformen mit GR-GFP, zeigte Änderungen des Expressionsmusters bei Bag-1L und Bag-1Lm, jedoch nicht bei Bag-1S und Bag-1Sm. Die Etablierung einer Methode zur *in vivo* Analyse von Glucocorticoid-Signalwegen in der Neuroneogenese von adulten Mäusen, war in ihren ersten Ansätzen erfolgreich, so dass diese nach einigen Optimierungen für weitere Analysen genutzt werden kann.

## Abstract

Missing Bag-1 leads to a lethal phenotype with strong defects in the nervous system and in the liver during mouse embryonic development. Besides the expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAP), a complex of Bag-1, Akt, Hsp70 and B-Raf is important for the phosphorylation of a specific aa-residue of the pro-apoptotic protein Bad to support survival (Gotz und Wiese et al., 2005). The aim of this work was to analyse the functions of the mouse Bag-1 isoforms during neuronal development with *in vitro* models.

The overexpression of Bag-1S and Bag-1L in PC12 cells showed that Bag-1S is localized in the cytoplasm and in the nucleus, Bag-1L only in the nucleus. A specific pointmutation, that is inhibiting the interaction with Hsp70, lead to a change in subcellular localisation. Bag-1Sm was predominantly expressed in the cytoplasm. The mutant Bag-1Lm showed no change in localization compared with Bag-1L. The overexpression of Bag-1S also lead to a strong reduced neurite length. Bag-1L and the mutant isoforms did not show this defect. Analysis of the signalling pathways including Akt and MAPK did not lead to a conclusive explanation. So the reason why Bag-1S reduces neurite growth remains speculative. Analysing *Bag-1*<sup>-/-</sup> neural stem cells showed an increase in apoptosis as expected when compared to *Bag-1*<sup>+/+</sup> neural stem cells. Bringing back Bag-1S and Bag-1L in the cells by viral infection they were able to survive again. The mutants did not show the rescue effect, telling that the interaction with Hsp70 is necessary for survival effects of Bag-1 in neural stem cells. *Bag-1*<sup>-/-</sup> neural stem cells also showed glial differentiation defects which could not be rescued by the Bag-1 isoforms. Additional experiments forcing neural stem cells into the glial lineage by application of CNTF or LIF showed that *Bag-1*<sup>-/-</sup> neural stem cells were able to differentiate into glial cells. Bag-1 is also known as a modulator of nuclear receptors, like the glucocorticoid receptor (GR). Cotransfection of the Bag-1 isoforms with GR-GFP lead to a change in expression pattern of Bag-1L and Bag-1Lm but not Bag-1S and Bag-1Sm. The establishment of an *in vivo* method for analysing the effects of glucocorticoid signalling pathways in neurogenesis in adult mice was successful and can be used after some more optimizing for further analysing.

# 1. Einleitung

Die Neuroneogenese und der programmierte Zelltod (Apoptose) sind wichtige Prozesse zur korrekten Entwicklung des Nervensystems in Vertebraten.

Die Neuroneogenese sorgt für die Bildung, Wanderung, Reifung und das Überleben neugebildeter Neurone. Mit Beginn der Definierung der neuralen Platte entstehen proliferationsfähige Stammzellen, die in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren können (Diez del Corral und Storey, 2001). Im Überschuss generierte neuronale und gliale Zellen werden mit Hilfe der Apoptose in ein geeignetes Gleichgewicht gebracht (Buss und Oppenheim, 2004). Die Zellen konkurrieren dabei um überlebensfördernde Faktoren, die vom Zielgewebe ausgeschüttet werden (Hamburger, 1992, 1993; Bus und Oppenheim, 2004).

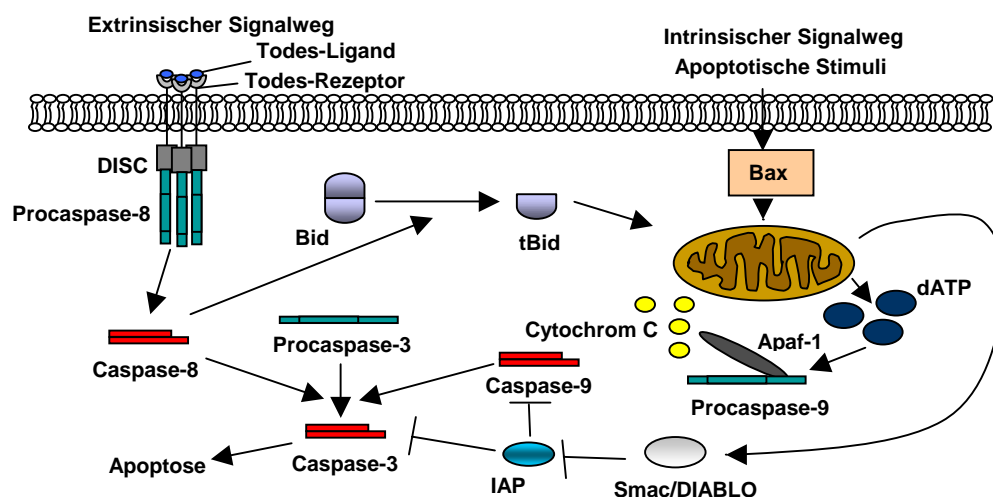
## 1.1 Der programmierte Zelltod

Die Apoptose ist ein konservierter Prozess metazoischer Organismen und unverzichtbar für ihre Entwicklung, Morphogenese, Gewebehomöostase und ihr Abwehrsystem gegen infizierte oder beschädigte Zellen (Vila und Przedborski, 2003). Exzessiver und unkontrollierter Zelltod kann jedoch zu Krankheiten führen. So ist z. B. das Absterben dopaminergischer Neurone die Ursache der Parkinsonschen Krankheit. Die Apoptose ist eine mögliche Form des programmierten Zelltods und beschreibt die morphologischen Ereignisse einer sterbenden Zelle (Clarke, 1999; Mattson, 2000). Die Membran schnürt kleine Vesikel ab, was als „membrane blebbing“ bezeichnet wird. Der Zellkörper schrumpft, und die DNA wird von Endonukleasen fragmentiert. Das Chromatin kondensiert, und es kommt zur Bildung von „Apoptotic Bodies“. Abhängig von der Art der Stimuli kann Apoptose über den extrinsischen und über den intrinsischen Signalweg aktiviert werden (Abb. 1).

Der extrinsische Signalweg wird über die Bindung extrazellulärer Todes-Liganden aktiviert, die an Todes-Rezeptoren wie Fas/CD95 oder Tumor-Necrosis-Factor (TNF) binden (Nagata, 1999). In der Zelle kommt es zur Bildung des Death-Inducing Signaling Complex (DISC), was zur Aktivierung der Caspasen führt (Peter und Kramer, 2003). Caspasen werden in Initiatoren (Caspasen-2, -8, -9, -10 in Säugern) und Effektoren (Caspasen-3, -6, -7 in Säugern) unterteilt (Riedl und Shi, 2004). Sie werden als inaktive Zymogene produziert und über proteolytische Spaltung aktiviert. DISC aktiviert die Initiator-Caspase-8, die wiederum die Effektor-Caspase-3 aktiviert,

welche den Zelltod initiiert (Shi, 2002; Adams und Cory, 2002; Peter und Kramer, 2003).

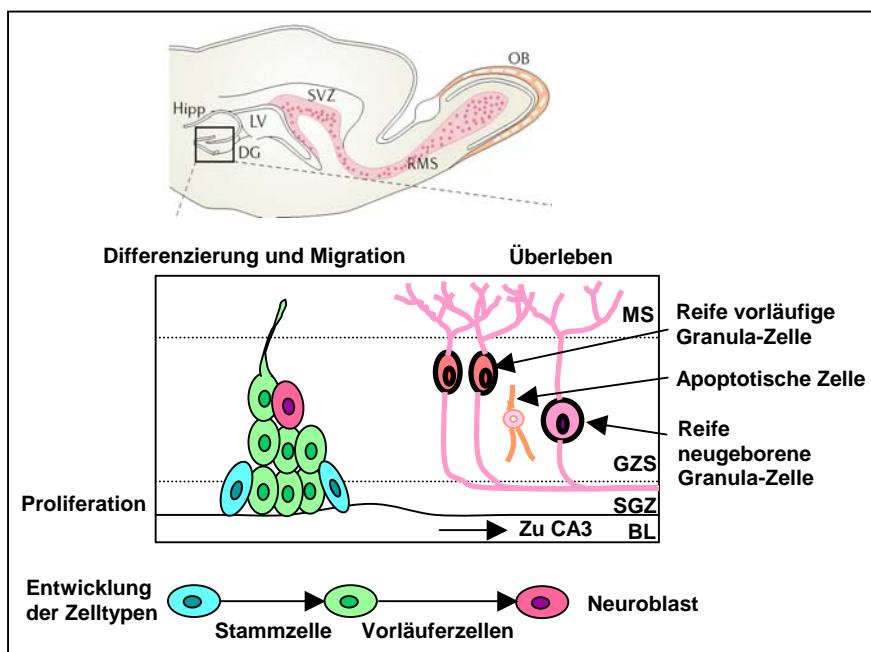
Beim intrinsischen Signalweg werden stress-induzierte Signale über pro-apoptotische Moleküle zu den Mitochondrien weitergeleitet (Wang, 2001). Dazu gehören die pro-apoptotischen Mitglieder der B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) Familie Bax, Bak, Bid, Bik, Bim und Bad. Sie können von den anti-apoptotischen Bcl-2 Mitgliedern Bcl-2 und Bcl-xL jedoch auch in ihrer Funktion unterdrückt werden (Gross et al., 1999; Cheng et al., 2001). An den Mitochondrien bewirken die pro-apoptotischen Moleküle die Freisetzung von Cytochrom C und anderen apoptotischen Faktoren wie z. B. Smac/DIABLO (second mitochondria derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI) aus dem Zwischenraum der mitochondrialen Doppelmembran. Smac/DIABLO interagieren mit den Inhibitor of Apoptosis Proteinen (IAP) und verhindern so, dass diese die Caspase-Aktivierung inhibieren (Chai et al., 2000; Srinivasula et al., 2000). Cytochrom C bindet derweil im Zytoplasma an Apaf-1 (Adaptor molecule apoptotic protease activating factor 1) und zusammen mit ATP aktiviert dieser Komplex (Apoptosom) die Initiator-Caspase-9, die die Caspase-3 aktiviert (Li et al., 1997). Die Aktivierung der Caspasen kann jedoch auch entweder durch Kontrolle der Zymogene oder über die IAP, die bereits aktivierte Caspasen inhibieren, gestoppt werden (Roy et al., 1997; Deveraux und Reed, 1999).



**Abb. 1: Apoptotische Signalwege.** Der extrinsische Weg läuft über die Aktivierung der Todes-Rezeptoren TNF-R1 oder Fas/CD95. Der intrinsische Signalweg bewirkt die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C. Beide Wege lösen eine Kaskade von Caspase-Aktivierungen aus, die die Apoptose einleiten. Moleküle wie die Inhibitor of Apoptosis Proteinen (IAP) oder anti-apoptotische Mitglieder der B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) Familie können die Apoptose jedoch verhindern. Ebenso sind beide Signalwege miteinander verknüpft. Die Spaltung des Moleküls Bid durch die Caspase-8 führt zur Freilassung mitochondrialer Proteine. Modifiziert nach Jesenberger und Jentsch, 2002.

## 1.2 Neuroneogenese

Die neuroepithelialen Zellen des Neuralrohrs besitzen selbsterneuernde multipotente Eigenschaften. Diese Neuralen Stammzellen können sich in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren, abhängig vom Zeitpunkt und Ort der Entwicklung. Die jungen Neurone wandern von ihrem Bildungsort, der ventrikulären Zone (VZ), entlang radialer Glia in die subventrikuläre Zone (SVZ). Die Neurone setzen sich in der entstehenden Subplatte und der kortikalen Platte ab. Nach dieser neuronengebenden Phase werden gliale Vorläuferzellen von den Stammzellen gebildet, die in der SVZ proliferieren. Postnatal werden die radialen Glia zu Astrozyten und die VZ verschwindet, während die SVZ in einigen Bereichen bis zum adulten Stadium erhalten bleibt (Temple, 2001). Dort agieren Astrozyten, welche die Grenze zwischen dem Stratum und den lateralen Ventrikeln bilden, als Neurale Stammzellen und bilden Neuroblasten, die zum Bulbus Olfactorius wandern und sich dort zu inhibitorischen Interneuronen differenzieren (Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Jankovski und Sotelo, 1996; Alvarez-Buylla et al., 2001; Alvarez-Buylla und Carcia-Verdugo, 2002; Rakic, 2002). In der subgranulären Zone des hippocampalen Gyrus Dentatus (DG) bilden ebenfalls Astrozyten Vorläuferzellen, die in granuläre Neurone des DG reifen (Abb. 2) (Stanfield und Trice, 1988; Kuhn et al., 1996; Markakis und Gage, 1999; Cameron und McKay, 2001; Rakic, 2002; Alvarez-Buylla und Carcia-Verdugo, 2002).



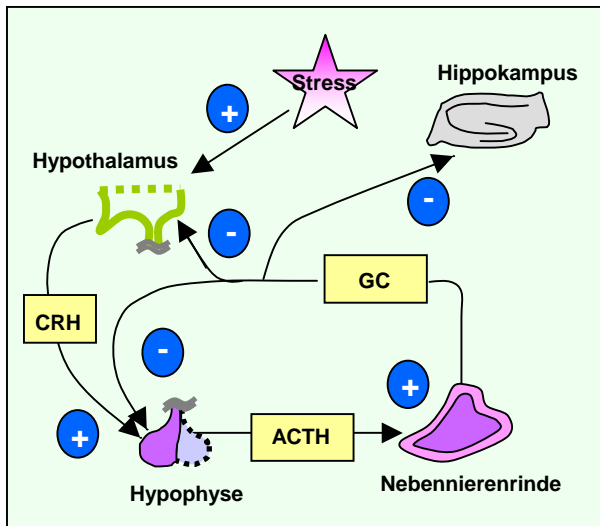
**Abb. 2: Adulte Neuroneogenese am Beispiel des Gyrus Dentatus.** Im Hippokampus (Hipp) sind die Stammzellen in der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus Dentatus (DG) lokalisiert. Diese produzieren Neuroblasten, die als Vorläuferzellen fungieren und später zu neuen granulären Neurone differenzieren. Deren Axone wachsen in die CA3 Region und ihre Dendriten in die molekulare Schichten. BL: Basale Lamina, GZS: Granuläre Zellschicht, MS: Molekulare Schicht. Modifiziert nach Lledo et al., 2006.

Die Prozesse der Neuroneogenese, die die Bildung, Wanderung, Reifung und das Überleben neugebildeter Neurone aus Neuralen Stammzellen beinhaltet, unterliegen vielen äußerlichen Einflüssen, wie z. B. Hormonen, Wachstumsfaktoren, Neurotransmittern, Verletzungen. Der Hippokampus ist ein Beispiel für die hohe Sensitivität neuronaler Zellen auf die o. g. äußerlichen Einwirkungen.

### **1.3 Der Einfluss von Stress auf den Hippokampus**

Stress wird in der Biologie als ein Zustand beschrieben, der zu einem Ungleichgewicht der physiologischen und psychologischen Homöostase von Organismen führt (Kim und Diamond, 2002). Er befähigt Organismen auf mögliche bzw. reale Bedrohungen schnell und effektiv zu reagieren, um sein Überleben zu sichern. Jedoch scheint unkontrollierter andauernder Stress einen negativen Einfluss auf bestimmte Bereiche der Gehirnfunktionen zu nehmen (McEwen und Sapolsky, 1995; Kim und Yoon, 1998; de Kloet et al., 1999).

Der Hippokampus ist in die Prozesse des Lernens und Gedächtnisses sowie in die neuroendokrine Regulierung von Stresshormonen involviert. Er ist wichtig für die Formation von stabilen deklarativen Erinnerungen im Menschen und räumlichen Erinnerungen in Nagern (Scoville und Milner, 1957; O'Keefe und Nadel, 1978; Morris et al., 1986; Squire und Zola-Morgan, 1991; Gabrieli, 1998; Moser et al., 1998; Eichenbaum, 2000). Des Weiteren weist er eine der höchsten Konzentrationen von Corticosteroid-Rezeptoren in Säugergehirnen auf, die wichtig sind für die Signaltransduktion von Stresshormonen (Reul und de Kloet, 1985). Der Hippokampus ist Bestandteil der sogenannten Hypothalamus-pituitary-adrenal-axis (HPA-Achse), die über Stress aktiviert wird und sich über eine negative Feedback-Schleife selbst reguliert (Abb. 3) (Sapolsky, 1992; McEwen und Sapolsky, 1995, Miller und Callaghan, 2005). Die Hypophyse produziert zwei Klassen von Steroiden: die Corticosteroide und die Androgene. Die Corticosteroide werden wiederum unterteilt in Mineralcorticoide wie Aldosterone und in Glucocorticoide (Cortisol im Menschen und Corticosterone in Nagern).



**Abb. 3: Die Stress-Kaskade.** Stress führt zur Aktivierung der Hypothalamus-pituitary-adrenal- (HPA-) Achse. Der Hypothalamus schüttet das Corticotropin-releasing hormone (CRH) aus, das die Hypophyse stimuliert, Adrenocorticotropin-hormone (ACTH) zu bilden. Dieses beeinflusst wiederum die Ausschüttung von Glucocorticoiden (GC). GC wirken ihrerseits negativ auf die Bildung von CRH, der Kreislauf wird so unterbrochen. Die HPA-Achse wirkt über eine negative Feedback-Schleife. Fehler in dieser Schleife können zu exzessiven Mengen an GC führen, die Schäden im Hippokampus bewirken. Modifiziert nach Miller und Callaghan, 2005.

Die Effekte werden über zwei Arten von intrazellulären Rezeptoren weitergeleitet: Typ 1 der Mineralcorticoid-Rezeptor mit einer hohen Affinität für Aldosterone und Corticosterone, Typ 2 der Glucocorticoid-Rezeptor (GR) mit einer hohen Affinität für Glucocorticoide (Reul und de Kloet, 1985; Conrad et al., 1997). Nach Liganden-Bindung bindet der aktivierte Rezeptor an spezifische Response-Elemente in der Promotorregion von Zielgenen zur Regulierung der Transkription (Beato et al., 1996; Hibberd et al., 2000). Dies hat verschiedene, teils gegensätzliche, physiologische Effekte in der Entwicklung, Änderungen im Verhalten sowie die Aufnahme von Stress, neuronale Schäden und Mechanismen zur Minderung von Schäden zur Folge (McEwen, 1998). Dabei scheinen die Effekte des Stresses hauptsächlich über die GR vermittelt zu werden (Joels und de Kloet, 1990; Conrad et al., 1997).

Abnormal hohe Level von Glucocorticoiden werden mit einer Reihe von psychischen Krankheiten und neuronalen Schäden verbunden. Patienten mit post-traumatischem Stress-Syndrom leiden unter hippokampalem Zellverlust (hippokampale Atrophie) und vermindertem Erinnerungsvermögen (Utto et al., 1993; Bremner, 1999). Auch Patienten mit affektiven Störungen oder dem Cushing-Syndrom (Tumore der Hypophyse produzieren erhöhte Mengen an Glucocorticoide) weisen o. g. Defekte auf (Starkman et al., 1992; Sapolsky, 2000). Die Gabe von Glucocorticoiden an gesunde Probanden zeigte auch verstärkt Probleme im Abrufen von Erinnerungen (Newcomer et al., 1994). Durch Regulierung des Glucocorticoid-Levels auf normales Niveau sind diese Defekte reversibel (Starkman, 1999). Auch in Nagern wirken erhöhte Level von Glucocorticoiden negativ auf das Erinnerungsvermögen (Luine et al., 1993; Diamond et al., 1996; de Quervain et al., 1993; Diamond et al., 1999). Die



Ausschüttung von Glucocorticoiden entweder durch chronischen Stress oder durch zusätzliche Gabe wird mit dem Verlust der apikalen Dendriten der hippocampalen pyramidalen Zellen in der CA3 Region assoziiert (McEwen, 2000). Synthetische Glucocorticoide, wie Dexamethason, wirken auf die granuläre Zellschicht im DG und auf das Striatum (Haynes et al., 2001). Glucocorticoide beeinflussen die hippocampale Neuroneogenese (Cameron und Gould, 1994; Hassan et al., 1996; Gould et al., 1997; Rodriguez et al., 1998; Tanapat et al. 1999; Coe et al., 2003; Montaron et al., 2006; Haynes et al., 2001). In Mäusen und Ratten konnte gezeigt werden, dass die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen im Hippokampus durch Stress oder die Gabe von Glucocorticoiden reduziert ist (Gould et al., 1997). Glucocorticoide führen bei T-Zellen zur Apoptose und somit zur Unterdrückung der Produktion von Zytokinen. Sie wirken daher immunsuppressiv und gegen Entzündungen (Thompson, 1999). Sie finden ihre Anwendung u. a. als Immunsuppressiva, Anti-Allergika und Anti-Inflammation-Medikamente, z. B. bei Multipler Sklerose. Die genauere Aufschlüsselung der Wirkungsweise von Glucocorticoiden auf die Funktionen im Gehirn kann besonders im Hinblick auf Reduktion von Nebenwirkungen bei medikamentöser Gabe helfen.

## **1.4 Die extrazelluläre Matrix**

Die extrazelluläre Matrix (EZM), umgeben von organisierten Gruppen von Zellen, dient als Grundsubstanz des extrazellulären Raums (Dityatev und Schachner, 2003). Sie ermöglicht Zellen aneinander zu binden und hat Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung (Teti, 1992). Aufgebaut ist sie aus einem Komplex verschiedener Proteine: Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin. Diese Proteine sind eingebettet in Polysaccharide und Proteoglykane, die eine gelartige Konsistenz der Matrix bewirken, in der die Proteine diffundieren können (Teti, 1992; Wehner und Gehring, 1995). Elastine und Kollagene ermöglichen es Geweben, sich nach Dehnung wieder zusammenzuziehen, während Laminine und Fibronectine in der Adhäsion wichtige Funktionen übernehmen (Teti, 1992). Während der Entwicklung des Nervensystems spielen Laminine eine wichtige Rolle. Sie sind involviert bei der Wanderung neuronaler Zellkörper zu ihrer vorbestimmten Region im Gehirn, beim Axonwachstum und bei der Synapsenbildung (Liesi, 1985; Zhou und Azmitia, 1988; Bronner-Fraser et al., 1992). Es sind biologisch aktive Glykoproteine, die während der Entwicklung in neuralen Geweben exprimiert werden

(Powell und Kleinman 1997). Laminin-1 hat die Fähigkeit, Neuritenwachstum und neuronale Migration verschiedener neuronaler Zelltypen *in vitro* (Calof und Lander, 1991; Lallier et al., 1994; Liesi et al., 1992; Fishman und Hatten, 1993; Calof et al., 1994; Liesie et al., 1995; Rivas und Hatten, 1995) sowie axonales Wachstum, Migration neuronaler Vorläuferzellen, Zell-Attachierung und Überleben *in vivo* zu stimulieren (Zhou und Azmitita, 1988; Edgar et al. 1984; Pixley und Cotman, 1986; Lallier und Bronner-Fraser, 1991; Powell und Kleinman, 1997). Dabei interagiert Laminin-1 mit verschiedenen zellulären Rezeptoren, um die neuronale Antwort zu vermitteln. Diese Rezeptoren bestehen aus Mitgliedern der Familie der Integrine (Reichardt und Tomaselli, 1991). Während Laminin-1, und auch Laminin-2 (Merosin), Neuritenwachstum fördert, inhibiert Laminin-3 das Auswachsen von Neuriten. Vermutlich gilt es während der Ausbildung der neuromuskulären Verbindung als Stoppsignal für Motoneurone *in vivo* (Porter et al., 1995).

## 1.5 Neurotrophe Faktoren

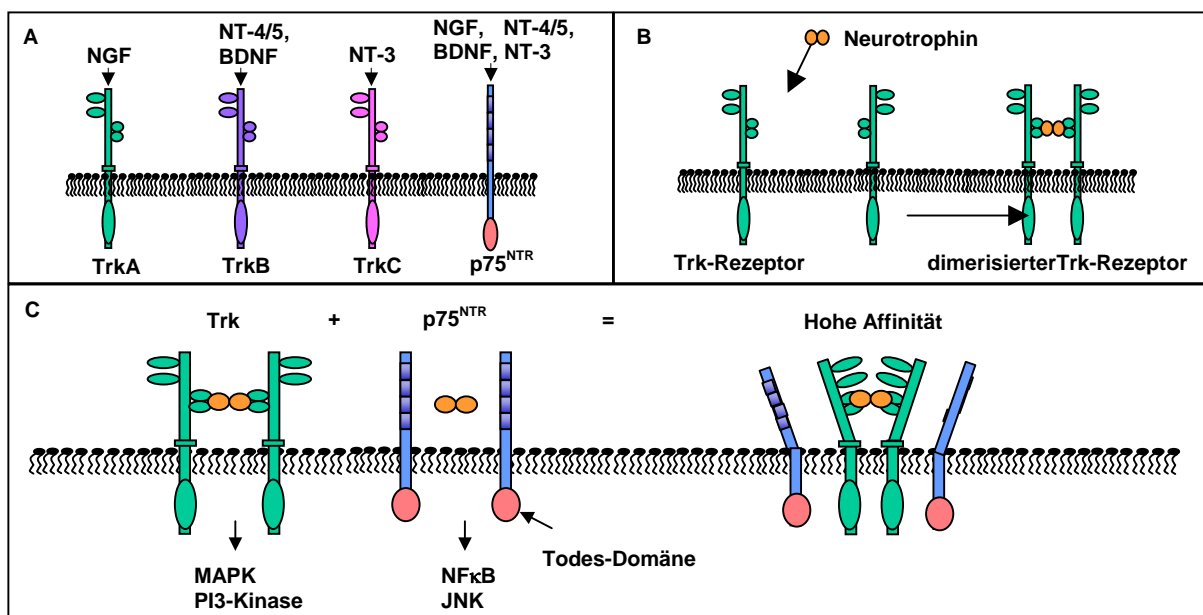
Neurotrophe Faktoren unterteilen sich in verschiedene Familien. NGF gehört zur Familie der Neurotrophine, wie auch BDNF (Brain-derived growth factor), NT-3 (Neurotrophin-3) und NT-4/5 (Neurotrophin-4/5) (Becker et al., 1998). Die CNTF/LIF Familie besteht aus CNTF (Ciliary neurotrophic factor), LIF (Leukemia inhibitory factor), CT-1 (Cardiotrophin-1) und CLC (Cardiotrophin-1-like zytokine) (Sendtner et al., 1990; Sendtner et al., 1996; Oppenheim et al., 2001; Forger et al., 2003), die Familie der Hepatocyten Wachstumsfaktoren aus HGF (Hepatocyt growth factor) (Wong et al., 1997). Daneben gibt es noch die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und IGF-2 (Pu et al., 1999) und die Glial-abstammenden neurotrophen Faktoren wie z. B. GDNF (Glial-derived growth factor) (Oppenheim et al., 2000).

### 1.5.1 Die Familie der Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Neurotrophine sind für die Entwicklung des Nervensystems in Vertebraten von enormer Bedeutung. Sie fördern das Überleben von Neuronen, bewirken ein verstärktes Dendriten- und Axonwachstum und wirken bei der Entwicklung von Synapsen mit. Sie agieren über transmembrane Rezeptorsignalwege: die transmembranen Tyrosin-Kinasen der Trk-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC (Tropomyosin-related-kinase) und den TNF (Tumor Necrosis Factor)-Rezeptor

p75<sup>NTR</sup> (Chao und Hempstead, 1995; Kaplan und Miller, 2000; Dechant und Barde, 2002).

Neurotrophine werden als unreife Neurotrophine exprimiert und erlangen ihr Reifung über proteolytische Spaltung (Mowla et al., 2001). Nach Bildung von Dimeren binden sie selektiv an spezifische Trk-Rezeptoren (Abb. 4) (Kaplan und Miller, 2000). Die Bindung von Neurotrophinen an bestimmte Rezeptoren ist abhängig von der Affinität zwischen Neurotrophin und Rezeptor: NGF und BDNF binden an TrkA bzw. TrkB nur mit geringer Affinität (Dechant et al., 1993; Mahadeo et al., 1994; Schropel et al., 1995). An p75<sup>NTR</sup> binden alle Faktoren mit gleicher Affinität. Nach Bindung eines Faktors dimerisieren die Rezeptoren, und es erfolgt eine Autophosphorylierung an den Tyrosinresten der zytosomatischen Kinasedomänen. Nach weiteren Phosphorylierungsschritten weiterer Tyrosinreste innerhalb der zytosomatischen Domäne können nun Effektormoleküle an die aktivierten Rezeptoren anlagern und so ihrerseits zu Substraten der Tyrosinkinase werden (Hempstead et al., 1991; Benedetti et al., 1993; Smeyne, et al. 1994; Bibel et al., 1999; Arevalo et al., 2000; Esposito et al., 2001).



**Abb. 4: Modell zur Trk-Rezeptor Aktivierung.** A: Neurotrophine binden selektiv an spezifische Trk-Rezeptoren, p75 bindet alle Neurotrophine gleichermaßen. B: Neurotrophine binden als Homodimere an die Rezeptoren, die darauf dimerisieren. Es erfolgt eine Autophosphorylierung an den Tyrosin-Resten der zytosomatischen Domäne. C: Jeder Rezeptor aktiviert verschiedene Signalwege und beeinflusst so verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Migration, Differenzierung. Eine Interaktion zwischen Trk- und p75<sup>NTR</sup> Rezeptoren ändert die Bindungsaffinität für Neurotrophine. BDNF: Brain derived growth factor, NGF: Nerve growth factor, NT: Neurotrophin, MAPK: Mitogen-activated protein kinase, PI3: Phosphatidylinositol, JNK: Jun N-terminale Kinase. Modifiziert nach Chao, 2003.

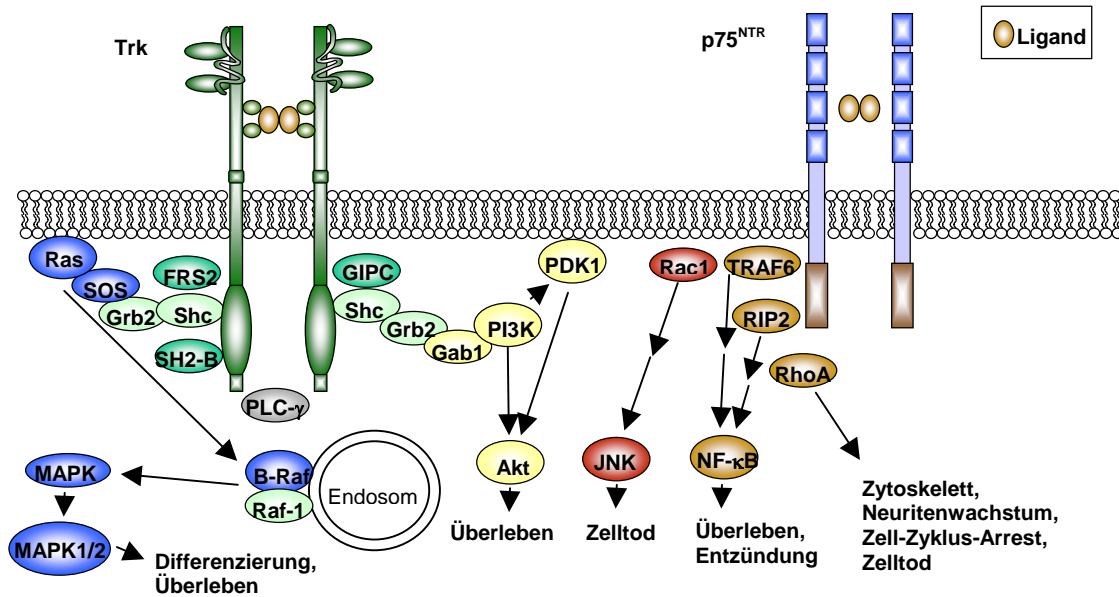
Es gibt Studien, die zeigen, dass p75<sup>NTR</sup> ein wichtiger Teil der hochaffinen Trk-Rezeptoren ist (Abb. 4). Durch Immunpräzipitation konnte nachgewiesen werden, dass p75<sup>NTR</sup> mit diesen interagieren kann (Barde et al., 2004). Weitere Experimente zeigen, dass die Affinität der Trk-Rezeptoren TrkB und -C in Abwesenheit von p75<sup>NTR</sup> erniedrigt ist (Hempstead et al., 1991; Benedetti et al., 1993; Bibel et al., 1999; Wiese et al., 1999 a). Außerdem scheint p75<sup>NTR</sup> in Abwesenheit von Trk-Rezeptoren Signale in die Zelle weiterzuleiten, obwohl er keine eigene enzymatische Aktivität besitzt. p75<sup>NTR</sup> führt nach Bindung von NGF zum Zelltod von Oligodendrozyten *in vitro* und retinalen Ganglienzellen *in vivo*. Dieser Mechanismus verläuft vermutlich über Effektoren, die an Sequenzen von p75<sup>NTR</sup> in der sogenannten Todesdomäne (Death Domain) binden (Kaplan et al., 1991).

### 1.5.2 Signaltransduktion von neurotrophen Faktoren

Nach der Aktivierung von Trk-Rezeptoren kommt es im Inneren der Zelle zur Rekrutierung und Phosphorylierung von Src Homologen und kollagen-ähnlichen (Shc) Adaptorproteinen, die zur Aktivierung des Phosphatidylinositol-3 kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt)- und des Ras/Raf/Mitogen-activated protein kinase (Ras/Raf/MAPK)-Signalwegs führen (Abb. 5) (Huang und Reichardt, 2001; Chao, 2003).

Der PI3K/Akt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle für neuronales Überleben. Von der PI3K gebildete Phosphatidylinositate aktivieren die Proteinkinase Akt, welche die Funktionen pro- und anti-apoptotischer Proteine über deren Phosphorylierung kontrolliert (Datta et al., 1999; Yuan und Yankner 2000). Das pro-apoptische Protein Bad, welches zur Bcl-2 Familie gehört, bindet an Bcl-xL, das das pro-apoptotische Protein Bax aktiviert. Phosphorylierung von Bad führt zur Interaktion mit 14-3-3 Proteinen und verhindert so die Aktivierung der Apoptose (Datta et al. 1997). Bad dient auch MAPK Substrat, die auf ähnliche Art und Weise die pro-apoptotische Wirkung von Bad verhindern (Bonni et al. 1999). Die Zunahme der Aktivität von Ras, induziert durch Neurotrophine, führt über B-Raf zur Aktivierung der MAPK. Dies beeinflusst u. a. die Induktion von dem zyklischen AMP-response element (CREB). Dieser Transkriptionsfaktor beeinflusst den Zell-Zyklus, das Neuritenwachstum und die Entwicklung von Synapsen (Lonze und Ginty, 2002). Die Aktivierung von p75 führt dagegen zur Zunahme der Jun N-terminalen Kinase (JNK), die den Signalweg der Apoptose einschlägt. Jedoch kann p75 auch zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und

Ceramiden führen, die das Überleben fördern oder auch über die Aktivierung von RhoA das Zytoskelett beeinflussen (Abb. 5).

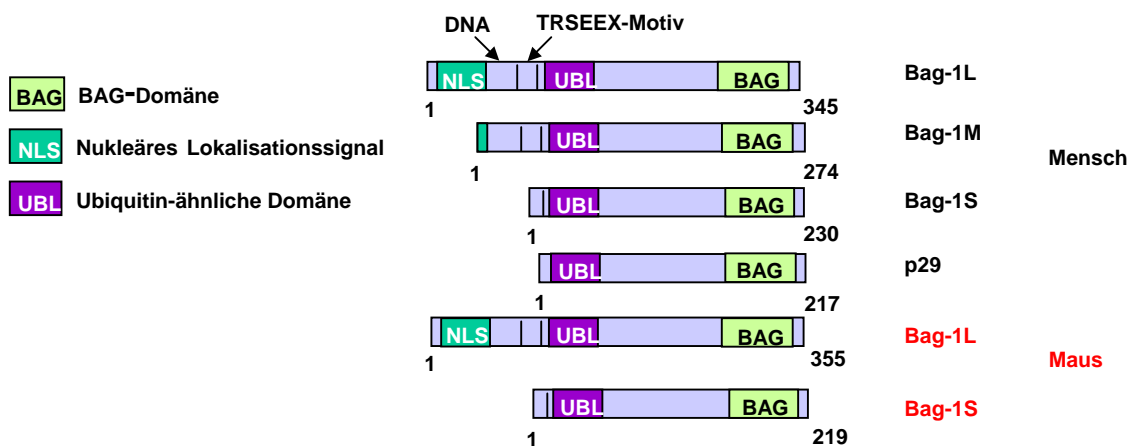


**Abb. 5: Neurotrophin Rezeptor Signalwege.** Trk Rezeptoren aktivieren den PI3K/Akt- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg und beeinflussen so zelluläre Differenzierung und Überleben. Der p75<sup>NTR</sup> Rezeptor jedoch aktiviert NF-κB und die Jun N-terminale Kinase (JNK) und beeinflusst über RhoA Überleben, Entzündungsprozesse, Zelltod, Neuritenwachstum und Wachstums-Arrest. Akt: Proteinkinase B, FRS2: fibroblast growth factor receptor substrate 2, Gab1: Grb2-associated binder-1, Grb2 growth factor receptor-bound protein 2, GIPC: GAIP interacting protein, MAPK: Mitogen-activated protein kinase, PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1, SH2B: Src homology 2-B, SOS: Son of Sevenless, TRAF6: tumor necrosis factor receptor associated-factor 6. Modifiziert nach Chao, 2003.

## 1.6 Bag-1 – ein multifunktionales Molekül

Bag-1 (Bcl-2 antagonist-1) wurde erstmals durch seine Interaktionen mit Bcl-2, einem anti-apoptischen Protein (Takayama et al., 1995), und mit dem GR entdeckt (Zeiner und Gering, 1995). Es gehört zur Familie der Bag-Proteine, deren Mitglieder sich auf sechs im *Homo sapiens* belaufen und deren Charakteristikum die Bag-Domäne ist (Abb. 6) (Takayama et al., 1999). Die verschiedenen Isoformen und Interaktionspartner von Bag-1 zeigen, dass es einen wichtigen Anteil an vielen zellulären Funktionen hat: Bag-1 wirkt auf den Zell-Zyklus und die Proliferation (Wang und Reed, 1998; Song et al., 2001), es interagiert mit nukleären Hormon-Rezeptoren, mit Protein-Tyrosin-Kinase-Rezeptoren wie Platelet-derived growth factor (PDGF), Wachstumsfaktoren wie Heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor (HGFGF) sowie mit Enzymen, die Ubiquitinierungs-Reaktionen katalysieren (Luders et al., 2000 b, c; Lin et al., 2001; Niyaz et al., 2003; Townsend et al., 2003).

Die Bag-1 Isoformen werden alle von einer mRNA durch verschiedene Translationsstartpunkte generiert (Packham et al., 1997). Bag-1L (50 kDa) besitzt ein alternatives CTG Translationsstartcodon, während für Bag-1M (46 kDa), Bag-1S (36 kDa) und p29 (29 kDa) die Translation über ATG Startcodons nach dem CTG Startcodon initiiert wird. In der Maus wurden bislang nur die Bag-1L (50 kDa) und die Bag-1S (32 kDa) Isoformen identifiziert, die eine starke Expression in der Embryonalentwicklung aufweisen. So werden beide Isoformen zum Zeitpunkt E10.5 verstärkt exprimiert, danach schwächer (Packham et al., 1997; Takayama et al., 1998; Crocoll et al., 2000). Bag-1L ist im Zellkern lokalisiert, Bag-1M sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma und Bag-1S hauptsächlich im Zytoplasma (Packham et al., 1997; Liu et al., 1998; Takayama et al., 1998). Die Lokalisation der Isoformen ist u. a. abhängig von nukleären Lokalisationsignalen (NLS) innerhalb der Sequenz. NLS ermöglichen Proteinen, in den Zellkern zu gelangen. Sie werden in einteilige, bestehend aus einem Cluster von basischen AS, oder zweiteilige gestuft, die zwei basische Regionen separiert von Spacer Regionen enthalten (Kalderon et al., 1984; Robbins et al., 1991). Bag-1L hat in der N-terminalen Domäne ein einteiliges NLS. Die anderen Bag-1 Proteine besitzen zweiteilige NLS im C-Terminus vor der Bag-Domäne (Zeiner und Gehring, 1995; Packham et al., 1997). Bag-1M und Bag-1S sind daher primär im Zytoplasma lokalisiert, können jedoch in den Zellkern mit Hilfe anderer Proteine transportiert werden, was abhängig von Zelltyp und Stress-Bedingungen ist (Zeiner und Gehring, 1995; Takayama et al., 1998; Kullmann et al., 1998).



**Abb. 6: Die Isoformen der Bag-1 Proteine.** Ihnen allen gemeinsam ist die namensgebende Bag-Domäne. Weitere Domänen sind die NLS- und UBL-Domänen und ein DNA-Bindungs-Motiv sowie mehrere Repeats des Hexapeptids-Motiv TRSEEX. Während im Menschen vier Bag-1 Isoformen bekannt sind, existieren in der Maus nur zwei davon. Die Isoformen unterscheiden sich in ihren N-terminalen Domänen. Die Zahlen neben den Proteinen stehen für die Anzahl an Aminosäuren. Modifiziert nach Alberti et al., 2003; Townsend et al., 2005.

### 1.6.1 Die Funktion der Bag-Domäne

Die Bag-Domäne besteht aus drei anti-parallelen amphiphatischen  $\alpha$ -Helices. Sie ist ca. 110–140 AS lang und liegt im C-terminalen Bereich der Isoformen (Briknarova et al., 2001; Sondermann et al., 2001). Die erste und die zweite Helix interagieren mit der Serin/Threonin-Kinase Raf-1, die zweite und die dritte mit den ATPasen-Domänen der Chaperone Hsc70/Hsp70 und des Tumor-Necrosis-Factor-R1 (TNF-R1) (Takayama et al., 2001; Sondermann et al., 2001; Song et al., 2001; Antoku et al., 2001). Die energieverbrauchende Bindung der Bag- und der ATPase-Domäne wird über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen in Bag-1 vermittelt. Die elektrostatischen Bindungen erfolgen über die hochkonservierten Reste Glu<sup>212</sup>, Asp<sup>222</sup>, Arg<sup>237</sup> und Gln<sup>245</sup> der Bag-Domäne. Mutationen in diesen Resten bewirken eine Abnahme in der Bindung zwischen beiden Domänen (Sondermann et al., 2001). Die Funktionen der Bag-Domäne liegen in der Förderung der ATP Hydrolyse von Hsc70 durch Austausch von ADP/ATP, sie benötigt dafür aber auch die Präsenz von einem weiteren Chaperon, Hsp40 (Hohfeld und Jentsch, 1997; Stuart et al., 1998; Luders et al., 1998; Gassler et al., 2001; Sondermann et al., 2001). Der ATP-Zustand führt abhängig von der Bag-Isoform zu einer verfrühten Entlassung des noch ungefalteten Substrates oder zur Zunahme der Chaperonaktivität (Hohfeld und Jentsch, 1997; Takayama et al., 1997; Zeiner et al., 1997; Bimston et al., 1998; Luders et al., 1998).

Des Weiteren ist die Bag-Domäne ein wichtiger Bestandteil für die anti-apoptotische Funktion von Bag-1 (Takayama et al., 1995). Über die Bindung an die Serin/Threonin-Kinase Raf-1, kann Bag-1 deren Aktivität stimulieren (Wang et al., 1996). Das aktivierte Raf-1 wiederum schaltet die MAPK an und fördert so das Zellwachstum. Es wird angenommen, dass Hsp70, welches vermehrt unter Stressbedingungen gebildet wird, mit Raf-1 um die Bindung an Bag-1 konkurrieren kann. Bindet Hsp70 an Bag-1 wird der Raf-1 Signalweg und somit der Zellzyklus unterbrochen. Bag-1 könnte also als molekularer Schalter funktionieren, der unter normalen Bedingungen Wachstum und Überleben fördert und unter Stress vermehrt diese Prozesse stoppt (Song et al., 2001). Auch in Tumoren konnte gezeigt werden, dass Zellwachstum und Überleben über die Bag-Domäne reguliert werden. So zeigten Brustkrebstumore, die mit Bag-defizienten Mutanten transfiziert wurden, vermindertes Wachstum und eine verringerte Tumorgroße (Kudoh et al., 2002).

### 1.6.2 Die Funktion der Ubiquitin-ähnlichen Domäne

Die Ubiquitin-ähnlichen (ubiquitin-like, UBL) Domäne liegt im N-terminalen Ende der Bag-1 Isoformen. Ubiquitin ist ein 76 AS großes Protein, das an Proteine angeheftet wird, welche über das Proteasom, einem heterooligomeren Proteasekomplex, abgebaut werden sollen. Diese Anheftung von Ubiquitin wird über Ubiquitin-konjugierende Enzyme und eine Ubiquitin Ligase vermittelt, welche nach entsprechender Modifizierung die markierten Proteine zur 26S Einheit des Proteasoms dirigieren (Varshavsky, 1997). Deletionen der UBL-Domäne in Bag-1 führen zu einer Inaktivierung der überlebensfördernden Funktionen (Bardelli et al., 1996; Yang et al. 2000). Die S- und die M-Isoform können mit dem 20S Kern und der 19S Untereinheit des Proteasoms interagieren; eine Funktion dieser Interaktion konnte bis jetzt jedoch noch nicht nachgewiesen werden (Luders et al., 2000 b; Demand et al., 2001; Alberti et al., 2002). Des Weiteren hat man gezeigt, dass Bag-1 mit CHIP, einer Ubiquitin-Ligase, interagiert. Diese heftet Ubiquitin-Moleküle an Bag-1 und fördert dadurch eine Interaktion mit dem Proteasom (Alberti et al., 2002). Bag-1 assoziiert mit dem Proteasom unter ATP-Verbrauch, der vermutlich über die 19S Proteasom-Untereinheit reguliert wird, und bildet *in vitro* einen stabilen Komplex (Luders et al., 2000 b). Gleichzeitig ist Bag-1 dabei in der Lage, an Hsc70 zu binden. Man vermutet daher, dass Bag-1 als Adapter-Molekül zwischen Proteasom und dem Hsc70/Hsp70 Komplex fungiert (Brimmell et al., 1999; Luders et al., 2000 b; Connell et al., 2001; Demand et al., 2001; Jiang et al., 2001; Murata et al.; 2001; Alberti et al., 2002).

### 1.6.3 Cochaperonaktivität von Bag-1

Die Hitzeschockproteine (Chaperone) Hsc70/Hsp70 sind wichtige Schlüsselfiguren bei der Reparatur beschädigter Proteine. Sie helfen diesen, ihre Konformation zu erhalten und bei der Proteinfaltung bereits denaturierter Proteine (Nollen und Morimoto, 2002). Bag-1 als Cochaperon ist in der Lage, die Aktivität der Chaperone als Nukleotidaustausch-Faktor negativ zu regulieren, wie bereits unter 1.6.1 beschrieben (Takayama et al., 1997; Nollen et al., 2000; Bukau et al., 2006). Der Einfluss auf die Chaperonaktivität ist abhängig von den verschiedenen Bag-1 Isoformen. Bag-1M inhibiert die Faltung von Proteinen durch Hsc70, während Bag-1S sie fördert (Luders et al., 1998). Beide Isoformen stimulieren jedoch die ATPase Aktivität auf dieselbe Art. Diese unterschiedlichen Effekte lassen sich daher nur

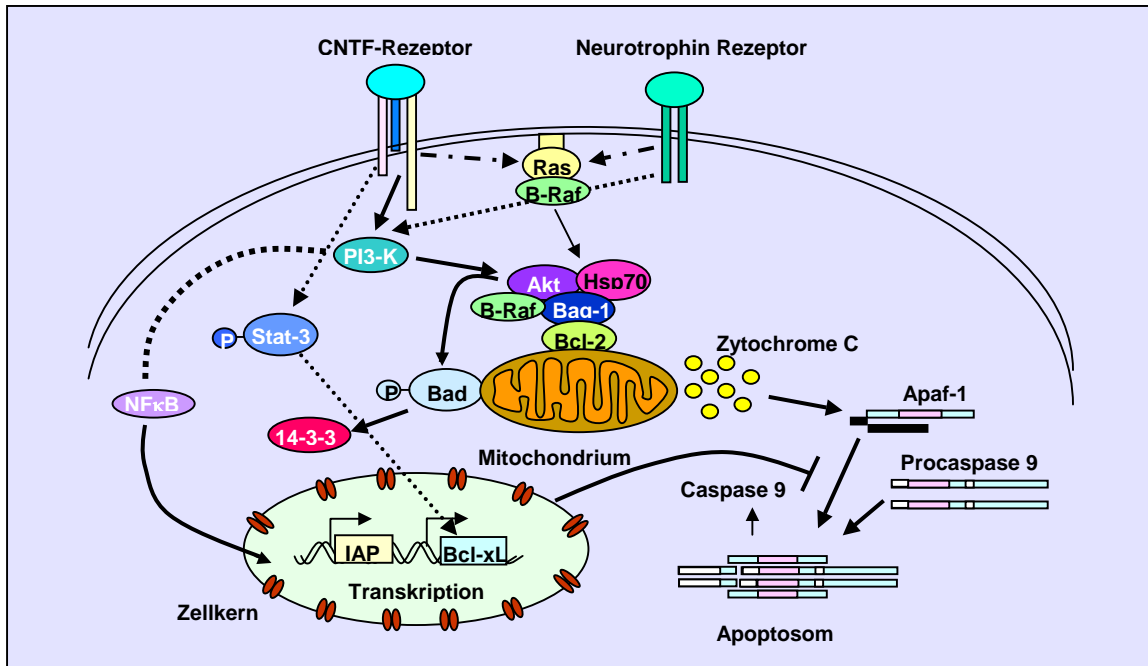


durch strukturelle Unterschiede erklären. Die Bag-1 Isoformen unterscheiden sich hauptsächlich an ihren N-terminalen Enden. Bag-1M besitzt im N-Terminus TRSEEX Repeats (Abb. 6), die eine amphipatische  $\alpha$ -Helix formen, deren negativ-geladene Reste dreireihig entlang der Helix-Achse postiert sind. Am äußersten N-Terminus sitzen sechs positiv-geladene Reste, die ein Cluster um die Helix-Spitze bilden und somit eine potenzielle Domäne für Protein-Protein-Interaktionen darstellen (Hohfeld, 1998). Bag-1S fehlt dieses positiv-geladene Cluster, was zu einer unterschiedlichen Bindungsfähigkeit möglicher Substratproteine führen könnte. Bag-1M kann z. B. denaturierte Proteine nach einem Hitzeschock stabilisieren, während Bag-1S dies nicht kann. Allerdings konnte bislang noch kein Komplex von Bag-1M und einem möglichen denaturierten Substrat isoliert werden (Luders et al., 2000 b). Jedoch wurden für Bag-1S auch inhibitorische und für Bag-1M auch stimulierende Effekte auf die Chaperonaktivität *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Bimston et al., 1998; Nollen et al., 2000; Terada und Mori, 2000; Gassler et al., 2001; Liman et al., 2005). Diese unterschiedlichen Beobachtungen der Cochaperonaktivität sind vermutlich abhängig vom Zelltyp, von der Konzentration und der Cofaktorexpression.

#### 1.6.4 Apoptose und Stressregulierung durch Bag-1

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass alle Bag-1 Isoformen Apoptose unterdrücken können (Takayama et al., 1995; Bardelli et al., 1996; Clevenger et al., 1997; Kullman et al., 1998; Yawata et al., 1998; Yang et al., 1999; Lin et al., 2001; Townsend et al., 2003). Allerdings konnte auch beobachtet werden, dass Bag-1 negativ auf zelluläres Überleben wirkt (Roth et al., 2000; Yang et al., 2000). Bag-1S interagiert mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2, welches an Mitochondrien lokalisiert ist. Bag-1 könnte dadurch also in der Lage sein, die Ausschüttung proapoptischer Faktoren wie z. B. Cytochrom C von den Mitochondrien zu verhindern. Dies wiederum inhibiert die Aktivierung von Caspasen und weiteren Enzymen, die an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind. Durch gezielte Genablation von *Bag-1* in Mäusen, erhält man einen embryonalen letalen Phänotyp, der ab E13 eintritt. E12.5 Embryonen weisen Defekte und massive Apoptose in der Leber und in dem sich entwickelnden Nervensystem des Vorderhirns auf. Auch die Expression der IAP ist in den *Bag-1* defizienten Mäusen stark reduziert. Des Weiteren ist ein Komplex aus B-Raf, Akt, Hsp70 und Bag-1 wichtig für die Phosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins Bad an Serin136. In den *Bag-1*  $-/-$  Mäusen waren sowohl der Komplex als

auch die Phosphorylierung gestört. Auch wurde gezeigt, dass in diesen Mäusen die mitochondriale Lokalisation von B-Raf und Akt verändert war. Man nimmt an, dass Bag-1 und Hsp70 in einem Komplex mit B-Raf und Akt an den Mitochondrien lokalisiert sind, wo die Phosphorylierung von Bad über Akt und/oder B-Raf stattfindet (Abb. 7) (Jablonka et al., 2004; Gotz und Wiese et al., 2005). Bag-1 scheint daher ein potenzieller Regulator der Apoptose zu sein und Einfluss auf die neuronale Entwicklung zu nehmen.

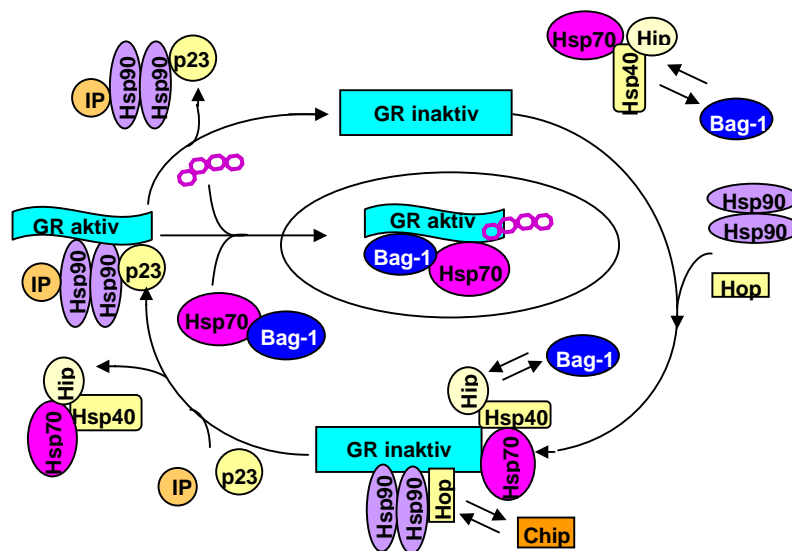


**Abb. 7: Der Einfluss von Bag-1 auf die Signalwege der Apoptose.** Über trophische Faktoren werden Signale über spezifische Rezeptoren in die Zelle weitergeleitet. Die Aktivierung von Ras führt zur Rekrutierung von B-Raf, welches wiederum die PI3-Kinase aktiviert. Diese phosphoryliert Akt, welches in einem Komplex aus Hsp70, B-Raf und Bag-1 an den Mitochondrien mit Bcl-2 lokalisiert ist. Dieser Komplex ist wichtig für die Phosphorylierung von Bad, das so die Cytochrom C Ausschüttung und somit Apoptose verhindert. Fehlt Bag-1, ist der Komplex und die Phosphorylierung von Bad gestört. Die Zelle stirbt. Die Aktivierung der PI3-Kinase kann gleichzeitig auch über NF- $\kappa$ B die Transkription anti-apoptotischer Proteine wie den IAPs oder Bcl-xL initiieren und so Apoptose inhibieren. Modifiziert nach Jablonka et al., 2004.

### 1.6.5 Modulation nukleärer Hormon-Rezeptoren durch Bag-1 am Beispiel des Glucocorticoid-Rezeptors

Nukleäre Hormon-Rezeptoren wie z. B. der GR agieren über Liganden-Bindung als Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Genen in unterschiedlichen biologischen Prozessen wie Zellproliferation, Morphogenese, Apoptose und Homöostase kontrollieren (Beato et al., 1995). In Abwesenheit von Hormonen liegen nukleäre Rezeptoren im Zytoplasma in einem sogenannten „unreifen“ Zustand vor. Treten nun Hormone in die Zelle ein, erfährt der Rezeptor einen „Reifungsprozess“ an dem

Chaperone und Cochaperone beteiligt sind. Zuerst bindet Hsp70 an den Rezeptor (Morishima et al., 2000), welches in seiner Aktivität durch seine Cochaperone Hsp40 und Hip (Hsp70 interacting protein) verstärkt wird, (Hohfeld et al., 1995; Dittmar et al., 1998). Ein weiteres Hsp70 Cochaperon, Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein), wirkt als Adaptorprotein und bringt ein Dimer von Hsp90 zu dem intermediären Komplex, der Aporezeptor genannt wird (Dittmar et al., 1997; Johnson et al., 1998; Chen und Smith, 1998). Hsp70 verlässt schließlich diesen Komplex, der nun von p23 und Immunophilinen stabilisiert wird. Der Rezeptor ändert seine Konformation, bindet Hormone und wandert in den Zellkern (Freeman et al., 1996; Dittmar et al., 1997 a, b; Young und Hartl, 2000). Bag-1 Proteine fungieren hier als negative Regulatoren von Hsp70 und unterdrücken diesen Prozess der Reifung durch Inhibierung der Substratfaltungsaktivität von Hsp70 (Hohfeld und Jentsch, 1997; Takayama et al., 1997; Zeiner et al., 1997; Bimston et al., 1998; Gebauer et al., 1998; Nollen et al., 2000; Kanelakis et al., 2000). Dabei konkurrieren Bag-1 Proteine mit Hip um die Bindung. Des Weiteren können Bag-1 Proteine die Rezeptoraktivität beeinflussen, indem sie zusammen mit dem Rezeptor und Hsp70 in den Zellkern gehen und dort die Bindung des Rezeptors an die DNA inhibieren (Kullmann et al., 1998; Cato und Mink, 2001).



**Abb. 8: Ein schematisches Modell zur Reifung des GR.** In Abwesenheit von Hormonen liegt der GR in einem Komplex aus Chaperonen und Cochaperonen (Aporezeptor-Komplex). Bag-1 kann dabei durch Bindung an Hsp70 die Reifung des GR verhindern. Fällt der Komplex ab, ändert der Rezeptor seine Konformation, bindet Hormone und wandert in den Zellkern. Dort dimerisiert er und bindet an spezifische Response-Elemente. Hsp70 und sein Cochaperon Bag-1 können ebenfalls in den Zellkern wandern und die Bindung des GR an die DNA abschwächen und so die Transkription inhibieren. Modifiziert nach Cato und Mink, 2001.

Es konnte gezeigt werden, dass Bag-1M und Bag-1L die Transaktivierung des GR vermindern. Bag-1M bindet mit seiner C-terminalen Region an die hintere Region des GR mit Hilfe von Hsp70 und bildet so einen Komplex, der nach Hormonbindung in den Zellkern transportiert wird (Abb. 8). Dort reguliert Bag-1M die Aktivität des GR durch eine kleine DNA-bindende Domäne von acht AS am Anfang der N-terminalen Domäne von Bag-1M. Zwei positive Ladungen in dieser Domäne interagieren mit den negativ geladenen Phosphatresten des DNA Rückgrats. Man vermutet, dass dies nach Interaktion des GR mit dem Chromatin der Glucocorticoid-Response-Elementen (GRE) zu einer Änderung der Chromatinstruktur durch rekrutierte Cofaktoren des Rezeptors führt. Anschließend bindet Bag-1M an die DNA, was die weiteren Funktionen des GR bei einer effizienten Transaktivierung stört (Kullmann et al., 1998; Schneikert et al., 1999; Schmidt, et al., 2003). Dieser Mechanismus ist außerdem spezifisch für den GR. Der Mineralcorticoid-Rezeptor, ein strukturelles und funktionelles Homolog zum GR, kann von Bag-1M nicht beeinflusst werden. Dies liegt vermutlich an verschiedenen AS-Kompositionen in der C-terminalen Region der Rezeptoren (Schneikert et al., 1999). Auch scheint eine Interaktion von Bag-1 mit Hsp70 nicht für alle Rezeptoren notwendig zu sein. So bindet Bag-1L an den AR und nicht Bag-1S oder Bag-1M. Wäre Hsp70 notwendig für diese Bindung, müssten auch Bag-1S und Bag-1M an den AR binden können. Zudem wird die Funktion des AR durch Bag-1L stimuliert und nicht inhibiert wie beim GR (Froesch et al., 1998; Schneikert et al., 1999). Bag-1 Proteine definieren demnach eine neue Klasse von Modulatoren nukleärer Rezeptoren. Sie beeinflussen Transport, Abbau, Faltung und die DNA-Bindungsfähigkeit dieser Rezeptoren.

## 1.7 Modellsysteme

Um die Signalmechanismen von neuronalen Prozessen während der Entwicklung, speziell mit Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen, *in vitro* untersuchen zu können, eignen sich neuronale Zelllinien und primäre neuronale Kulturen als Modellsysteme.

Die Pheochromozytoma-Zelllinie PC12 ist ein beliebtes Modellsystem zur Untersuchung neuronaler Differenzierung. Sie überlebt und proliferiert in serumhaltigem Medium. Wird das Serum entzogen, sterben die Zellen. Die Zugabe von NGF ohne Serum führt zum Überleben und zu einem neuronal-ähnlichen Phänotyp (Greene und Tischler, 1976). Die Zellen stoppen die Proliferation, beginnen Neuriten auszu-

wachsen, bilden Aktionspotentiale und exprimieren neuronale Gene. NGF führt über TrkA zur Aktivierung des Ras/Raf/MAPK- und des PI3K/Akt-Signalwegs, was die Phosphorylierung von Akt und MAPK zur Folge hat (Hemmings, 1997).

Neurale Stammzellen können von verschiedenen Regionen des Gehirns der Maus isoliert und in Kultur gehalten werden (Temple, 2001). Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren zum Kulturmedium bleiben Neurale Stammzellen in einem proliferativen Zustand und bilden nach wenigen Tagen sogenannte Neurosphären, Aggregate einzelner Zellen. Werden ihnen die Faktoren entzogen, beginnen sie, sich auf Substrat, z. B. Laminin-1, in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren. Anhand dieses Modellsystems kann der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Differenzierung und das Überleben Neuraler Stammzellen *in vitro* untersucht werden.

## 1.8 Ziel der Arbeit

In ihrer Funktion als Cochaperone sind Bag-1 Proteine u. a. an der Faltung von Proteinen beteiligt (Takayama et al., 1995; Luders et al., 1998). Sie besitzen anti-apoptotische Fähigkeiten (Takayama et al., 1995), interagieren mit dem Proteasom (Luders et al., 2000 b) und können nukleäre Rezeptoren in ihrer Transaktivierung fördern oder inhibieren (Zeiner und Gehring, 1995; Schneikert et al., 1999). Ein völliges Fehlen von Bag-1 in Mäusen führt zu schweren Defekten des Nervensystem (Gotz und Wiese et al., 2005).

In dieser Arbeit soll eine funktionelle Analyse der Bag-1 Maus-Isoformen in der neuronalen Entwicklung anhand von *in vitro* Modellen erfolgen. Neben der subzellulären Lokalisation soll deren Einfluss auf das Neuritenwachstum in PC12 Zellen und auf das Überleben sowie auf die Differenzierung von Neuralen Stammzellen analysiert werden. Durch eine Punktmutation, die eine Interaktion mit dem Chaperon Hsp70 verhindert, soll außerdem eine mögliche Beteiligung von Hsp70 in diese zellulären Prozesse näher charakterisiert werden. Des Weiteren soll anhand des *in vitro* Modells der Neurale Stammzellen eine erste funktionelle Analyse der Maus Bag-1 Isoformen in der GR-Aktivierung erfolgen. Für spätere *in vivo* Analysen soll außerdem eine geeignete Methode etabliert werden, die es ermöglicht, den Einfluss von Glucocorticoiden auf die Neuroneogenese im Hippokampus adulter Mäuse zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Konfokales Mikroskop TSP2	Leica, Wetzlar
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Göttingen
BioDocAnalyse für Agarose Gele	Biometra, Göttingen
Inkubatoren für Zellkultur	Kendro, Hanau
Image Reader LAS-3000	Fujifilm, Straubenstadt
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Sequenziergerät ABI 3130	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterile Werkbank	Kendro, Hanau
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Horizontal-Elektrophorese-Kammer	Biometra, Göttingen
Transfer-Blot-Kammer	Biometra, Göttingen
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Vertikal-Elektrophorese-Kammer	Biometra, Göttingen

#### 2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Applichem, Gibco-BRL, Merck, Sigma-Aldrich, Roche Diagnostics und Roth bezogen. Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (Aqua bidest.) angesetzt.

#### 2.1.3 Medien, Nährböden und Lösungen für Bakterienkulturen

LB-Flüssigmedium	Bacto-Trypton	10 g/l
(Luria Bertani-)	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
		pH 7,5

LB-Agar	Bacto-Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Agar	15 g/l
	pH 7,5	

Zur Sterilisierung wurden die Medien 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

Antibiotika	50 mg/ml Ampicillin
	50 mg/ml Kanamycin

Die Antibiotika wurden sterilfiltriert, bei -20°C gelagert und den Lösungen in einer Verdünnung von 1:1000 zugesetzt.

### 2.1.4 Material für molekularbiologische Methoden

Plasmid-Isolations-Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
1 kb-Marker ( <i>Smart Ladder</i> )	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)	MBI-Fermentas, St Leon-Rot
<i>Pwo</i> -Polymerase	PeqLab, Erlangen
dNTPs (PCR grade)	MBI-Fermentas, St Leon-Rot
T4-Ligase	MBI-Fermentas, St Leon-Rot
Sequenzier-Kit	AB Big Dye v3.1, Darmstadt
DyeEx TM 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.5 Lösungen für molekularbiologische Methoden

#### Alkalische Lyse (Mini-Präparation, Birnboim und Doly, 1979)

Lösung A	50 mM Glukose
	25 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA, pH 8,0
	10 µg/ml RNase

Lösung B	1 % SDS 0,2 M NaOH
Lösung C	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure (96 %)
50X TAE	Tris/Base Essigsäure 0,5 M EDTA pH 8
6X DNA-Ladepuffer	50 % Glyzin 15 mM EDTA 0,15 % Bromphenolblau 0,15 % Xylencyanol
Ethidiumbromid-Lösung	10 µg/ml

### **Isolierung genomischer DNA aus Gewebe**

<i>Tail</i> -Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM EDTA 150 mM NaCl 0,5 % SDS 10 mg/ml Proteinase K
---------------------	--

### **2.1.6 Material für biochemische Methoden**

Prestained Marker	MBI-Fermentas, St. Leon Rot
Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schüll
Protein-A bzw. -G Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Complete Protease Inhibitor</i>	Roche Diagnostics, Mannheim



## 2.1.7 Lösungen für biochemische Methoden

### Herstellung von Proteinlysaten

RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 250 mM NaCl 10 % Glycerol 1 % Triton-X100 1,5 mM MgCl 0,01 % $\beta$ -Mercaptoethanol 1 mM Natrium-Ortho-Vanadate 2,5 mM NaF 1 Tablette <i>complete protease inhibitor</i> (Roche) pro 10 ml Puffer
-------------	---

### Für Immunpräzipitation

RIPA-Puffer	
Waschpuffer 1	RIPA-Puffer 500 mM NaCl 1 Tablette <i>complete protease inhibitor</i> (Roche) pro 10 ml Puffer
Waschpuffer 2	RIPA-Puffer 150 mM NaCl 1 Tablette <i>complete protease inhibitor</i> (Roche) pro 10 ml Puffer

### SDS-PAGE

Trenngel	7,5 %, 10 % oder 12,5 % Acrylamid 0,375 M Tris pH 8,8 0,1 % SDS 4 $\mu$ l/ml 10 % Ammoniumpersulfat 0,72 $\mu$ l/ml TEMED
----------	---

Sammelgel  
4 % Acrylamid  
0,1 % SDS  
6 µl/ml 10 % Ammoniumpersulfat  
0,72 µl/ml TEMED

5X Probenpuffer  
15 % SDS  
50 % Glycerol  
15 % β-Mercaptoethanol  
1,5 % Bromphenolblau

10X SDS Laufpuffer  
25 mM Tris  
250 mM Glyzin  
0,1 % SDS

### Western-Blot

Blot-Puffer  
2,5 mM Tris  
25 mM Glyzin  
0,01 % SDS  
20 % Methanol

### Immundetektion

10X TBS  
0,5 M Tris/Base  
9 % NaCl  
pH 7,6

1X TBS-T  
50 mM Tris/Base  
0,9 % NaCl  
0,1 % Tween-20  
pH 7,4

Blockpuffer  
5 % Magermilchpulver  
0,1 % Tween  
1X TBS

“Stripping”-Puffer		0,2 M NaCl 0,5 M Glyzin pH 2,8
ECL	Lsg. A	100 mM Tris/HCl pH 8,3 0,4 mM P-Coumaric Acid 2,5 mM Luminol Solution
	Lsg. B	100 mM Tris/HCl pH 8,3 1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## 2.1.8 Material und Lösungen für Immunhistochemie

### Kryoschnitte

O.C.T. <sup>TM</sup> Einbettmedium	Tissue Tek®
0,15 M Phosphatpuffer	2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O 2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O pH 7,4
1X PBS	PAA Laboratories, A-Pasching pH 7,4
4 % PFA	4 % Paraformaldehyd 1X PBS
30 % Sacharose-Lsg.	30 % Sacharose 0,15 M Phosphatpuffer

### BrdU-Färbung

10X TBS	Tris/Base NaCl pH 7,4
---------	-----------------------------

Blockpuffer	1X TBS 0,25 % Triton-X100 5 % GS 2 % BSA pH 7,4
DNA-Denaturierung-Lösung	2 N HCl
Neutralisierungs-Puffer	0,1 M Borat-Puffer pH 8,5
Waschpuffer	1X TBS pH 7,4
DABCO	25 mg/ml DABCO 3X Glycerol 1X PBS
DAPI	1 mg/ml

### **2.1.9 Material und Lösungen für Immunzytochemie**

Blockpuffer	15 % Ziegenserum 0,3 % Triton-X100 1X PBS pH 7,4
1X PBS	PAA Laboratories, A-Pasching pH 7,4
DAPI	1 mg/ml

### 2.1.10 Faktoren, Medien und Lösungen für die Zellkultur

Die Medien, Zusätze und Faktoren stammen, wenn nicht anders angegeben, von Gibco-Invitrogen, Linaries, PAA Laboratories, Cell Concepts und Sigma.

bFGF	50 µg/ml	Cell Concepts, Umkirch
mEGF	50 µg/ml	Cell Concepts, Umkirch
NGF	50 µg/ml	Cell Concepts, Umkirch
LIF	5 µg	Chemicon, Nürnberg
Poly-DL-Ornithin	0,1 mg/ml	Sigma, Hamburg
Laminin-1		Dr. Timpl, Max-Planck-Institut, Martiensried
Dexamethason	100 µM	Sigma, Hamburg
RU38458	50 mg/ml	Sigma, Hamburg
Trypsin/EDTA	2,5 %	
Trypsin	1 %	
Trypsin-Inhibitor	1 %	

Medium für HEK293T Zellen: DMEM + L-Glutamine  
5 % FCS  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

Medium für PC12 Zellen: DMEM + L-Glutamine  
10 % HS  
5 % FCS  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

Medium für Neurale Stammzellen: Neurobasalmedium (NB)  
50X B27  
10X Glutamax  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

### 2.1.11 Bakterienstämme

JM-109 *e14–(McrA–) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK– mK +) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]*

### 2.1.12 Zelllinien

HEK293T Zellen Humane Nierenfibroblasten mit einer stabilen Integration des large T-Antigens des SV-40 Virus

PC12 Zellen Ratten Pheochromozytoma Zellen aus einem Chromafinzellen-Tumor der adrenalen Medulla

### 2.1.13 Plasmide

Plasmid	Resistenz	Herkunft
pEGFP-C1	Kan <sup>R</sup>	Clontech, Heidelberg
pCDNA3-2xHA	Amp <sup>R</sup>	W. Rossoll, unpubliziert
pGJ3-CMV-GFP	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pCDNA3-2xHA-Bag-1S	Amp <sup>R</sup>	W. Zisimopoulos, unpubliziert
pCDNA3-2xHA-Bag-1Sm	Amp <sup>R</sup>	W. Zisimopoulos, unpubliziert
pCDNA3-2xHA-Bag-1L	Amp <sup>R</sup>	W. Zisimopoulos, unpubliziert
pCDNA3-2xHA-Bag-1Lm	Amp <sup>R</sup>	W. Zisimopoulos, unpubliziert
pEGFP-C1-Bag-1S	Kan <sup>R</sup>	W. Zisimopoulos, unpubliziert
pEGFP-C1-Bag-1Sm	Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEGFP-C1-Bag-1L	Kan <sup>R</sup>	W. Zisimopoulos, unpubliziert
pEGFP-C1-Bag-1Lm	Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pK7-GR-GFP	Amp <sup>R</sup>	freundliche Gabe von A. Cato
pGJ3-CMV-GFP-Bag1S	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGJ3-CMV-GFP-Bag1Sm	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGJ3-CMV-GFP-Bag1L	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGJ3-CMV-GFP-Bag1Lm	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pcZ-VSVG	Amp <sup>R</sup>	N. Orel

**Tabelle 1: Verwendete Plasmide.** Die aufgeführten Plasmide wurden in dieser Arbeit für Klonierungen benutzt oder dienten als Expressionsvektoren für eukaryotische Zellen.

### 2.1.14 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide	Gen	Sequenz
BAGS114	<i>Bag-1</i>	GTT GTC ACC AGC CTT ACC TTA GC
BAGA106	“	ACT TCT AGT CAA CTC CCT GCT GCT
3'neo	“	GAT TCG CAG CGC ATC GCC TT
Bag1s_rev1	“	TTC CTC CGT CTG GAC CAT CTC CTC G
Bag1_fw1	“	GGA GAT TGA CAC AAT GGT CTT ACC
Bag1L_rev1	“	CAC AGA GGA ACG CTG AGA GGG AGG
GFP_rev	<i>eGFP</i>	GAA CTT CAG GGT CAG CTT GCC

**Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide.** Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von Invitrogen bezogen und in dieser Arbeit zur Sequenzierung oder PCR verwendet.

### 2.1.15 Antikörper

Antikörper	Referenz
Maus $\alpha$ -B-Raf, monoklonal	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg
Maus $\alpha$ -Hsp70 (Heatshockprotein), monoklonal	Biomol, Hamburg
Maus $\alpha$ -Nestin, monoklonal	Chemicon, Nürnberg
Meerschweinchen $\alpha$ -doublecortin (dbc), polyklonal	“
Kaninchen $\alpha$ -Neurofilament (NF)-M, polyklonal	Abcam, England
Maus $\alpha$ -O4, monoklonal	Chemicon, Nürnberg
Maus $\alpha$ -Glial Fibrillaric Acid (GFAP), monoklonal	Boehringer, Mannheim
Kaninchen $\alpha$ -Microtubule-Associated-Protein (MAP2), polyklonal	Chemicon, Nürnberg
Maus $\alpha$ -Glucocorticoid Receptor (GR), monoklonal	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg
Kaninchen $\alpha$ -Glucocorticoid Receptor (GR), polyklonal	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg Abcam, England
Kaninchen $\alpha$ -Akt, polyklonal	New England Biolabs, Frankfurt a. Main
Maus $\alpha$ -MAPK, monoklonal	“

Maus $\alpha$ -P(44/42)-MAPK, monoklonal	“
Kaninchen $\alpha$ -P(S473)-Akt, polyklonal	“
Maus $\alpha$ -Bag-1, monoklonal	Biomol, Hamburg
Kaninchen $\alpha$ -Bag-1, polyklonal	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg
Maus $\alpha$ -Actin, monoklonal	Chemicon, Nürnberg
Maus $\alpha$ -BrdU, monoklonal	Roche, Mannheim
Kaninchen $\alpha$ -GFP, polyklonal	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg
Ziege $\alpha$ -Maus-POD	Dianova, Hamburg
Ziege $\alpha$ -Kanninchen-POD	”
Ziege $\alpha$ -Maus-Cy2	”
Ziege $\alpha$ -Maus-Cy3	”
Ziege $\alpha$ -Kanninchen-Cy2	”
Ziege $\alpha$ -Kanninchen-Cy3	”
Ziege $\alpha$ -Kanninchen-Cy5	”
Ziege $\alpha$ -Meerschweinchen-Cy3	”
Ziege $\alpha$ -Ratte-Cy3	”

**Tabelle 3: Verwendete Antikörper.** Die aufgeführten Antikörper wurden für indirekte Immunfluoreszenz in der Immunhistochemie und in der Immunzytochemie verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Die alkalische Lyse ist eine schnelle Methode, um Plasmid-DNA einer Bakterienkultur zu gewinnen. Dazu wurden 3 ml Übernachtskultur (LB + Antibiotikum) 1 Minute bei 16000 g (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert und das Sediment in 100  $\mu$ l Lösung A resuspendiert. Durch Zugabe von 200  $\mu$ l Lösung B wurden die Bakterien für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden 150  $\mu$ l gekühlte Lösung C zugegeben, der Ansatz 4–6 Mal invertiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach



Zentrifugation für 5 Minuten bei 16000 g (Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen und durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol die Plasmid-DNA gefällt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 16000 g wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen, nochmals 5 Minuten bei 16000 g zentrifugiert, luftgetrocknet und anschließend in 50 µl Aqua bidest. gelöst.

### **2.2.1.2 Isolierung von DNA im präparativen Maßstab**

Um DNA in großem Maßstab und einem hohen Reinheitsgrad zu gewinnen, wurde der Maxi-Präparationskit von Quiagen verwendet. Bakterien einer 200 ml Übernachtskultur (LB+Antibiotikum) wurden 20 Minuten bei 4000 g, 4 °C (Eppendorf Zentrifuge) sedimentiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

### **2.2.1.3 Präparation von genomischer DNA**

Bei diesem Verfahren wurde embryonales Gewebe mit 500 µl tail-Puffer versetzt und über Nacht bei 60 °C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Verdau der Proteine wurde jeweils 430 µl 5 % SDS- und 170 µl einer 3 M NaCl-Lösung dazugegeben und 20 Sekunden mit dem Vortex gemischt. Nach Zugabe von 750 µl Chloroform erfolgte wieder ein Mischen mit dem Vortex für 20 Sekunden. Anschließend wurden die Ansätze bei 16000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß transferiert und erneut mit 750 µl Chloroform versetzt und auf dem Vortex gemischt. Durch eine weitere Zentrifugation (16000 g, 10 Minuten, 4 °C), wurde die obere Phase abgetrennt, in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, die genomische DNA mit 1 ml Ethanol gefällt und zehn Minuten bei 16000 g, 4 °C pelletiert. Das Präzipitat wurde in 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und kurz an der Luft getrocknet. Danach wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung genomischer DNA erfolgte bei 4 °C.

### **2.2.1.4 Enzymatischer Restriktionsverdau von DNA**

Die Enzyme und Puffer wurden gemäß Herstellerempfehlungen eingesetzt. Für analytische Zwecke wurde 1 µg DNA in einem Volumen von 20 µl, für präparative Zwecke 5–10 µg DNA in einem Volumen von 30 µl verdaut. Das eingesetzte Volumen des Enzyms betrug maximal 1/10 des Gesamtvolumens des Ansatzes. Der

Restriktionsverdau erfolgte für 2–12 Stunden bei 37 °C. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese.

### **2.2.1.5 DNA-Gelelektrophorese**

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes erfolgte in Agarose-Flachbett-Gelen. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde 0,8–1,4 % Agarose in 1X TAE-Puffer Ethidiumbromid (1,5 µl / 50 ml) verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6X DNA-Ladepuffer versetzt. Die Gel-Elektrophorese erfolgte in 1X TAE-Puffer bei 10-15 V/cm<sup>2</sup>. Anschließend wurde das Gel auf einem UV Transilluminator fotografisch dokumentiert. Als DNA-Größenmarker wurden 8 µl *1 kb DNA Smart ladder* verwendet.

### **2.2.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten**

Um DNA-Fragmente (PCR-Produkten oder Plasmid-DNA) von Proteinen, RNA, Salzen und Nukleotiden zu reinigen, wurde ein Verdau oder PCR-Ansatz zunächst in einem Ethidiumbromid-Agarosegel geeigneter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde dann mit dem Qiaex Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Diese Methode beruht auf der Auflösung der Agarose in Anwesenheit von Natriumiodid und der Bindung der DNA an Glasmilch unter leicht sauren Bedingungen. Anschließend wurde die DNA durch einen alkalischen Puffer wieder in Lösung gebracht. Die auf diese Weise isolierte DNA konnte direkt zur Ligation eingesetzt werden.

### **2.2.1.7 Dephosphorylierung linearisierter DNA**

Um eine Religation eines durch einen Restriktionsverdau linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden der DNA mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden nach einem Restriktionsverdau 40 µl des linearisierten Vektors mit 5 µl 10X Dephosphorylierungspuffer versetzt und in einem Gesamtvolumen von 50 µl nach Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Durch eine weitere Inkubation von 15 Minuten bei 85 °C wurde die alkalische Phosphatase zerstört. Anschließend wurde die DNA in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und das Fragment des linearisierten Vektors aus dem Agarosegel extrahiert.

### 2.2.1.8 Auffüllen von 5' DNA-Enden

Vektoren und Fragmente mit überhängenden 5' DNA-Enden, können durch dNTPs aufgefüllt werden. Dazu wurden 50 µl des über eine Gelelektrophorese gereinigten DNA-Fragmentes oder Vektors mit 10 µl 10X Pwo-Polymerase-Puffer, 1 mM dNTPs, 2,5 µl Pwo-Polymerase und in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 30 Minuten bei 72 °C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Agarosegel eluiert.

### 2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wird durch die DNA-Ligase katalysiert. Das Enzym verknüpft unter ATP-Verbrauch eine 3'-OH-Gruppe mit einer 5'-Phosphat-Gruppe kovalent unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Für die Ligation eines DNA-Fragmentes mit einem linearisierten Vektor wurde im Standardansatz 1 µl des gereinigten Vektors, 7 µl des gereinigten DNA-Fragmentes, 2 µl Ligase-Puffer, 1 µl PEG (bei Ligationen mit glatten Enden) und 1 µl T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Der Ligationsansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

### 2.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurde die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm gemessen. 50 µg/ml doppelsträngige DNA bzw. 40 µg/ml RNA entsprechen einer  $OD_{260}$  von 1,0. Durch das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  lässt sich eine Aussage über den Grad der Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen machen. Bei reinen Nukleinsäuren liegt der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0.

### 2.2.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1985) erlaubt die Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Für die Amplifikation wurde als Template 1–5 µl cDNA, Plasmid-DNA oder genomische DNA eingesetzt. Der erste Schritt eines PCR-Programms im Thermocycler besteht aus dem Trennen des Doppelstrangs der Template-DNA (Denaturierung bei 94–95 °C). Durch Senken der Temperatur hybri-

disieren nun die spezifischen Primer mit komplementären DNA-Bereichen (Annealing). Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide. Im nächsten Schritt (Elongation) erfolgt wieder eine Erhöhung der Temperatur auf 72 °C, die optimale Reaktions-Temperatur für die Taq-Polymerase, die durch Primerextension einen neuen Strang synthetisiert. Dieser Zyklus wird mehrere Male durchlaufen. Die Vervielfältigung der Zielsequenz verläuft exponentiell. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden über eine Gel-Elektrophorese aufgetrennt und fotografisch dokumentiert.

Komponenten	cDNA als Template	Genomische DNA als Template
Template	2 µl	1 µl
Aqua bidest.	41,5 µl	16,15 µl
10X Reaktionspuffer	5 µl	3 µl
dNTP-Mix [10 mM]	1 µl	3 µl
Primer	0,5 µl	0,3 µl
Primer	0,5 µl	0,3 µl
Polymerase	0,5 µl	0,3 µl
Betaine	–	6 µl
Gesamtvolumen	50 µl	30 µl

Tabelle 4: Die verwendeten PCR-Reaktionsansätze.

Programm	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Bag-1	Denaturieren	95 °C	2 min	1x
	Denaturieren	95 °C	30 s	35x
	Annealing	64 °C	30 s	
	Elongation	72 °C	2 min	
	Elongation	72 °C	10 min	1x

Tabelle 5: Die verwendeten Thermocycler-Programme.

### 2.2.1.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Sequenzen erfolgte nach der Didesoxy-Ketten-terminations-Methode (Sanger et al., 1977) mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (ABI) unter Verwendung eines Sequenzier-Kits nach Anleitung des Herstellers. Die Aufreinigung der Sequenzierreaktion wurde mit dem DyeEx™ 2.0 Spin Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Die anschließende Analyse der Sequenzen erfolgte mit Hilfe von PubMed.

Komponenten	Ansatz für Plasmid-DNA als Template
Template	150–200 ng
Aqua bidest.	x µl
Terminatormix	2 µl
Sequenzierpuffer	3 µl
Primer [10 pmol]	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 6: Verwendete PCR-Ansätze für Sequenzierungen.

Programm	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Sequ	Denaturieren	95 °C	2 min	1x
	Denaturieren	95 °C	30 s	25–30x
	Annealing	50-60 °C primerabhängig	30 s–4 min	
	Elongation	72 °C	2 min	
	Elongation	72 °C	10 min	1x

Tabelle 7: Verwendete Thermocycler-Programme für Sequenzierungen.

### 2.2.1.13 Herstellung von kompetenten Bakterien für die Hitzeschocktransformation

Eine 100 ml Bakterienkultur in exponentieller Wachstumsphase ( $OD_{600}=0,4-0,5$ ) wurde 15 Minuten auf Eis gekühlt, durch Zentrifugation bei 4200 rpm für 15 Minuten bei 4 °C sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 33 ml RF1 resuspendiert. Es erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 15 Minuten und eine

anschließende Zentrifugation bei 3000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 8 ml RF2 resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde in Eppendorfgläsern zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

RF1	100 mM RbCl
	50 mM MnCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O
	30 mM KoAC
	10 mM CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O
	15 % Glyzerin
	pH 5,8
RF2	10 mM MOPS
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O
	15 % Glyzerin
	pH 6,8

#### **2.2.1.14 Transformation durch Hitzeschock**

100 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit bis zu 500 ng Plasmid-DNA oder 2 µl eines Ligationsansatzes gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 Sekunden auf 42 °C erwärmt und nach dem Hitzeschock auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurde die Bakteriensuspension eine Stunde bei 37 °C, 175–300 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien zunächst durch Zentrifugation bei 4000 g für 5 Minuten sedimentiert, 800 µl des Überstandes wurde verworfen, die Bakterien im verbliebenen Medium resuspendiert und der gesamte Transformationsansatz auf einem Selektionsmedium ausgestrichen. Die Agarplatte wurde für 12–16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

## **2.2.2 Proteinbiochemie**

### **2.2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten**

Zur Herstellung von Proteinlysaten zur Expressionsanalyse in Neuralen Stammzellen, PC12 oder HEK293T Zellen wurde eine konfluent bewachsene 10 cm Kulturschale mit einem Police-Rubberman (Hartenstein) geerntet und durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 g, 4 °C sedimentiert. Die präzipitieren Zellen wurden zweimal mit 1 ml gekühltem PBS gewaschen, in 100–1000 µl gekühltem RIPA-Puffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Je 2 µl Lysat wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen. Das restliche Lysat wurde mit 20–200 µl 5X SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C gekocht und bei -20 °C gelagert.

### **2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe des BioRAD DC Protein Assay (Lowry-Methode). Hierbei wurde BSA als Standard benutzt.

### **2.2.2.3 Immunpräzipitation**

Durch Immunpräzipitation können Proteinkomplexe z. B. aus Zellextrakten mit spezifischen Antikörpern gereinigt werden. Dabei werden die Antikörper über ihre Fc-Regionen an eine Matrix gekoppelt (Schneider et al., 1982). Als Matrix kann Protein-A bzw. Protein-G Agarose dienen. Antigen und spezifisch gebundene Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert. Die Antikörper bleiben dabei weitgehend an der Matrix gebunden. Für eine Immunpräzipitation wurden PC12 Zellen einer 10 cm Kulturschale mit einem Police-Rubberman (Hartenstein) geerntet und durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 g, 4 °C (Eppendorf) sedimentiert. Die präzipitieren Zellen wurden zweimal mit 1 ml gekühltem PBS gewaschen und in 1 ml gekühltem RIPA-Puffer resuspendiert. Für die Kontrolle der Proteinexpression wurden 20 µl Lysat mit 5 µl 5X SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C und bei -20 °C gelagert. Ein Vorreinigungs-Schritt des restlichen Lysats mit 5 % Protein-A oder -G Agarose für 30 Minuten bei 4 °C auf einem Überkopf-Schüttler, anschließender Zentrifugation bei 1000 g für 5 Minuten bei 4 °C entfernte nicht-spezifische Adsorption von unwichtigen zellulären Proteinen an die Protein-A bzw. -G

Agarose. Der Überstand wurde mit primären Antikörper in einer Endkonzentration von 1 µg/ml versetzt und für 24 Stunden bei 4 °C im Überkopf-Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 % Protein-A bzw. -G Agarose und eine Inkubation von 1 Stunde bei 4 °C im Überkopf-Schüttler. Danach wurde die Agarose für 5 Minuten bei 1000 g, 4 °C sedimentiert, der Überstand abgenommen und in einem separaten Eppendorfgefäß bei -80 °C gelagert. Die Agarose wurde in 4 Waschschritten mit jeweils 1 ml gekühltem Waschpuffer 1, in einem Waschschriff mit 1 ml gekühltem Waschpuffer 2 gewaschen und durch Zentrifugation bei 1000 g für 5 Minuten bei 4 °C sedimentiert. Die Überstände wurden jeweils in frischen Eppendorfgefäßen gesammelt und bei -80 °C gelagert. Gebundene Proteine wurden dann mit 60 µl 2X SDS-Probenpuffer von dem Agarose-Sediment bei 95 °C für 5 Minuten von den Beads gelöst. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

#### **2.2.2.4 Western Blot (*semi-dry* Blot)**

Der elektrophoretische Transfer aufgetrennter Proteine von Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose-Membranen erfolgte nach Kyshe-Andersen in einer Horizontalblotkammer. Auf die Anodenplatte der Apparatur wurden 2 Schichten Whatman 3MM-Papier, die zuvor in Transferpuffer getränkt worden waren, aufgelegt und blasenfrei mit 1 feuchten Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll), dem Polyacrylamidgel und 2 weiteren Lagen getränkten 3MM-Papiers überschichtet. Nach dem Auflegen der Kathodenplatte wurden die Proteine für 2 Stunden bei einem Strom von 1 mA/cm<sup>2</sup> auf die Membranfläche transferiert. Der erfolgreiche Transfer wurde durch reversibles Anfärben der Nitrozellulose mit Ponceau S überprüft. Die Membran wurde dazu 5 Minuten mit Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit Aqua dest. entfärbt, bis die Proteine durch eine rote Färbung sichtbar waren.

#### **2.2.2.5 Immundetektion von Proteinen**

Für den Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern wurde vor der Immundetektion die Membran für mindestens 1 Stunde mit Blocklösung behandelt und anschließend mit einem in Blockpuffer verdünnten ersten Antikörper (1. AK) für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Entfernen von unspezifisch gebundenen Antikörpern wurde die Membran dreimal für je 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion des



Antikörper wurden die Membranen dann mit der Verdünnung eines geeigneten Antikörper-Peroxidase-Konjugats (2. AK) in Blocklösung für 1 Stunde inkubiert und wie zuvor gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der 2. AK über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Dazu wurde die Membran für 2 Minuten mit einem Gemisch der Lösungen A und B (1:1) des ECL-Systems gleichmäßig bedeckt. Nach dem Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen und die Chemolumineszenz-Signale für Zeitintervalle von 30 Sekunden bis 30 Minuten aufgenommen. Um anschließend zur Wiederverwendung des Blots die gebundenen Antikörper wieder von der Membran zu entfernen, wurde der Blot 15 Minuten in TBS-T gewaschen und in *Stripping*-Puffer für 30 Minuten in einem 37 °C Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in TBS-T (15 Minuten) konnte mit der üblichen Absättigungs-Reaktion für den nächsten Antikörper fortgefahren werden.

<b>1. Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>2. Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
$\alpha$ -B-Raf	1:1000	$\alpha$ -Maus-POD	1:2000
$\alpha$ -Bag-1	1:1000	$\alpha$ -Maus-POD	1:2000
$\alpha$ -Bag-1	1:1000	$\alpha$ -Kanninchen-POD	1:2000
$\alpha$ -GFP	1:1000	$\alpha$ -Kanninchen-POD	1:2000

**Tabelle 8: Verwendete Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen.**

## **2.2.3 Immunhistochemie**

### **2.2.3.1 Immunologischer Nachweis von BrdU-Inkorporation auf histologischen Schnitten**

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden ausschließlich Kryostat-Schnitte verwendet. Hierfür wurden Gehirne von Mäusen durch Perfusion mit 4 % PFA in 1X PBS fixiert, freipräpariert und über Nacht bei 4 °C nachfixiert. Anschließend wurden die Objekte in 30 % Sucrose/PBS bei 4 °C in sterilen Röhrchen inkubiert. Nachdem das Gewebe mit der Lösung durchtränkt war, was sich durch Absinken zeigte, wurde das Objekt in O.C.T. *Tissue Tek* eingebettet und bei -20 °C eingefroren. Mit Hilfe des Kryotoms wurden 20  $\mu$ m- Schnitte bei -20 °C bis -30 °C hergestellt, auf SuperFrost-Objektträger übertragen, 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bei -20 °C

gelagert. Die benötigte Anzahl an Schnitten wurden 20–30 Minuten an der Luft getrocknet. Die Objektträger wurden beschriftet und die Schnitte mit einem Pap-Pen umrandet. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Schnitte in 2 N HCl für 30 Minuten bei 37 °C, um die DNA zu denaturieren. Zwei Waschschrte in 0,1 M Borat-Puffer, pH 8,5 für je 10 Minuten sorgten für eine Neutralisierung der HCl. Darauf folgten 3 Waschschrte mit 1X TBS, je 10 Minuten. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer in Blockpuffer inkubiert. Danach wurde eine Verdünnung des Antikörpers  $\alpha$ -BrdU (Roche, 1:400) in Blockpuffer auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrte mit 1X TBS für je 10 Minuten. Der zweite Antikörper  $\alpha$ -mouse-Cy3 (Dianova, 1:300) wurde zusammen mit DAPI (Sigma, 1:2000) in Blockpuffer verdünnt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte wieder ein dreimaliger Waschschrte (1X TBS, je 10 Minuten). Die Schnitte wurde vorsichtig abgeklopft und mit DABCO unter einem Deckglas mit Nagellack versiegelt.

## **2.2.4 Tierversuche**

### **2.2.4.1 Tierhaltung**

Die Tierhaltung erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem künstlichen Tag- und Nachtrhythmus bei kontrollierter Temperatur von (21±1) °C und 50–60 % relativer Luftfeuchtigkeit.

### **2.2.4.2 Injektion von NaCl, BrdU und Dexamethason in Mäuse**

Es wurden 6–12 Wochen alte Bl/6 Männchen eingesetzt. Am ersten Tag wurde allen Mäusen intraperitoneal eine BrdU-Injektion injiziert. Nach 3 Stunden bekam ein Teil der Mäuse eine Dexamethason-Injektion (Dex-Mäuse), der andere Teil bekam NaCl (Kontroll-Mäuse). Die zweite BrdU-Injektion wurde 6 Stunden nach der ersten in alle Mäuse injiziert. Nach 24 Stunden wurden Kontroll- und Dex-Mäuse perfundiert. Die restlichen Mäuse erhielten nach 24 und nach 48 Stunden 2 weitere BrdU-Injektionen im Abstand von 6 Stunden. 72 Stunden nach der Dexamethason-Injektion wurden sie ebenfalls perfundiert.

0,9 % NaCl	10 µl/g Körpergewicht
BrdU	in 0,9 % NaCl c=10 mg/ml 100 µg/g Körpergewicht
Dexamethason	in 0,9 % NaCl c=5 mg/ml 50 µg/g Körpergewicht

### 2.2.4.3 Perfusion

6–12 Wochen alte Bl/6 Mäuse wurden mit Äther sehr stark narkotisiert bis keine Atmung mehr sichtbar war. Der Brustkorb wurde geöffnet und das Herz freigelegt. Mit einer Feinschere wurde die rechte Kammer perforiert. Mittels einer Perfusionspumpe wurde 4 % PFA über eine Kanüle in das linke Ventrikel des Herzens circa 10 Minuten injiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kanüle nicht durch das Septum gestoßen wurde. Anschließend wurde die Maus dekapiert und das Gehirn präpariert. Es erfolgte eine Nachfixierung in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C.

## 2.2.5 Zellkultur

### 2.2.5.1 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden nach zügigem Auftauen im 37 °C Wasserbad in 15 ml Kulturröhrchen mit 5 ml vorgewärmtem Medium überführt. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 g (Eppendorf Zentrifuge) wurde das Medium abgesaugt, das Zellsediment in 5 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und in eine entsprechende Zellkulturflasche überführt.

### 2.2.5.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Konservierung von Zellen wurde das Medium von adhärent gewachsenen Zellen abgesaugt, die Zellen durch Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C abgelöst und mit 10 ml Medium gemischt. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 rpm (Omnifuge, Heraeus) wurde das Zellsediment in 1 ml Einfriermedium (DMSO +

Kulturmedium im Verhältnis 1:9) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden in einem Isopropanolbad über Nacht langsam auf -80 °C gefroren, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

### **2.2.5.3 Präparation von Neuralen Stammzellen**

Die Generierung der *Bag-1*<sup>-/-</sup> Mäuse erfolgte nach Gotz und Wiese et al., 2005. Es wurden heterozygote Bl6-Weibchen mit heterozygoten 129SV-Männchen verpaart. Die Präparation der Neuralen Stammzellen erfolgte an E11.5. Die Mäuse wurden mit Äther betäubt und durch Genickbruch getötet. Die Bauchhöhle wurde geöffnet und die Embryonen freigelegt. Das Vorderhirn wurde präpariert und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße mit je 100 µl HBSS auf Eis überführt. Der embryonale Körper wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäße mit je 500 µl *Tail*-Puffer überführt und für genomische DNA-Isolierung und anschließende Genotypisierung weiterverwendet. Das Vorderhirn wurde mit 1 % Trypsin versetzt und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Deaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von 1 % Trypsin-Inhibitor. Durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipetieren wurde der Gewebeverband vereinzelt und anschließend in eine Zellkulturflasche mit Neurobasalmedium, 1X B27, 1X Glutamax, 1X Pen/Strep, mEGF und bFGF (EK je 20 ng/ml) überführt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Dabei wurde die Zellsuspension in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 400 g sedimentiert. Das überschüssige Medium wurde vorsichtig abgesaugt ohne das Zellsediment zu stören. Dieses wurde anschließend in 1 ml frischem Medium resuspendiert und in eine neue Flasche mit frischem Medium überführt.

### **2.2.5.4 Calciumphosphat-vermittelte Transfektion von HEK293T Zellen**

Zur transienten Expression rekombinanter Proteine wurden HEK293T Zellen mittels Calciumphosphat Kopräzipitation transfiziert. Für Transfektionen von Zellen in 10 cm Kulturschalen wurden konfluente HEK293T Zellen einen Tag vor der Transfektion 1:4 passagiert, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70–80 % erreichten. Pro 10 cm Kulturschale wurden 860 µl H<sub>2</sub>O mit 10 µg DNA, 100 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> und 1 ml 2X HBS-Puffer gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz vorsichtig auf die Zellen gegeben und 8 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz wieder abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium zugegeben. Nach 24–48 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen geerntet, Proteinlysate hergestellt und die Expression mittels Western Blot analysiert.

2X HBS Puffer	274 mM NaCl
	10 mM KCl
	1,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O
	15 mM Glucose
	42 mM Hepes
	pH 7,01–7,05

### 2.2.5.5 Lentivirale Transfektion

Für die lentivirale Transfektion wurden HEK293T Zellen wie oben beschrieben mit den entsprechenden Expressionkonstruktion transfiziert. Für die Überexpression des zu analysierenden Proteins wurde das entsprechende Vektor-Plasmid (z. B. pGJ3-CMV-GFP) und ein Helfer-Plasmid (pcZ-VSVG) zu gleichen Teilen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Induktion der Virenproduktion durch Zugabe von 160 µl 500 mM Na-Butyrate pro 10 cm Kulturschale. Nach 8 Stunden Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 5 ml Medium gewaschen und anschließend in 10 ml frischem Medium weiter bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dabei wurde Kulturmedium genommen, welches dem Medium der zu infizierenden Zellen entspricht. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium abgenommen und mit 0,45 µm Filter steril filtriert. Das Filtrat wurde auf die zu analysierenden Zellen gegeben, so dass die produzierten Viren in dem Filtrat diese infizieren konnten. Nach weiteren 24–48 Stunden wurde das Medium abgesaugt, die Zellen geerntet oder fixiert und analysiert.

### 2.2.5.6 Transfektion von PC12 Zellen mit Lipofectamine® 2000

PC12 Zellen wurden zu 400000 Zellen pro well (24well Platte, Nunc) ausplattiert und 24 Stunden im Brutschrank unter Standardbedingungen in DMEM + L-Glutamine +

10 % HS + 5 % FCS + P/S + NGF (EK 50 ng/ml) kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. Pro Transfektionsansatz wurden 3 µg Lipofectamine in 50 µl Optimen langsam hinzupipettiert, durch vorsichtiges Rühren mit der Pipetten-Spitze gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurde 1 µg Plasmid-DNA pro Transfektionsansatz in 50 µl Optimen vorgelegt. Beide Ansätze wurden anschließend vorsichtig gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel: Das alte Medium wurde abgesaugt und durch 400 µl/well Transfektionsmedium (DMEM + 10 % HS + 5 % FCS + NGF (EK 50 ng/ml) - P/S) ersetzt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz (100 µl/well) langsam tropfenweise dazugegeben. Es erfolgte eine weitere Kultivierung für 24 Stunden im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). Am nächsten Tag wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen in 1 ml Differenzierungsmedium (Kultivierungsmedium 1:20 mit DMEM verdünnt + NGF (EK 50 ng/ml)) durch mehrmaliges Abspülen des Bodens mit einer Pipette gelöst und durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Mit einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden pro coverslips (Ø 10 mm, Hartenstein, Poly-DL-Ornithin/Laminin-1 beschichtet) 15000 Zellen in 150 µl Differenzierungsmedium ausplattiert. Es erfolgte eine Kultivierung im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) für 72 Stunden, wobei nach 8–24 Stunden ein erneuter Mediumwechsel erfolgte.

### **2.2.5.7 Transfektion von Neuralen Stammzellen mittels Elektroporation**

Die Transfektion erfolgte mit dem Mouse NSC Nucleofactor Kit von Amaxa nach Angaben des Herstellers. Durch Elektroporation wird die Eukaryotenzellwand durch einen elektrischen Impuls kurzfristig für Plasmid-DNA permeabel. Mit dieser Transfektionsmethode wurden Neurale Stammzellen transient transfiziert. Die Transfektion wurde nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die mitgelieferten Lösungen Nucleofactor Solution (2,25 ml) und Supplement (0,5 ml) wurden gemischt. Die gemischte Lösung war stabil bis zu 3 Monate bei 4 °C. Vor der Transfektion wurde sie auf Raumtemperatur aufgewärmt. Neurale Stammzellen wurden mit Medium in einem Falcon gesammelt, durch Pipettieren vollständig dissoziiert und ihre Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (Eppendorf, 400 rpm, 5 Minuten, ohne Bremse) und das Medium abgesaugt. Mindestens  $2 \cdot 10^6$  Zellen wurden in 100 µl Nucleofactor

Solution pro Transfektionsansatz aufgenommen. Diese Suspension wurde mit 5–10 µg DNA gemischt und der gesamte Ansatz in die mitgelieferte Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde in den Elektroporator (Amaxa) gestellt und mit dem Programm A-33 elektroporiert. Danach wurden 500 µl vorgewärmtes Medium (NB + P/S + B27) in die Küvette gegeben. Mit der mitgelieferten Plastikpipette konnte die komplette Lösung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt werden. Von dieser Lösung wurden 6000 Zellen pro vorbereitetem coverslip (Ø 10 mm, mit Poly-DL-Ornithin/Laminin-1 beschichtet) ausplattiert in NB + Glutamax + P/S + B27 + mEGF + bFGF und im Inkubator bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C für 24 Stunden kultiviert.

### **2.2.5.8 Indirekte Immunfluoreszenz**

Zum Nachweis rekombinanter oder endogener Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz wurden das Kulturmedium von Neuralen Stammzellen oder PC12 Zellen abgesaugt und durch 4 % PFA in 1X PBS (erwärmt auf 37 °C) ersetzt. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend dreimal für je 5 Minuten mit 1X PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern, wurden die Zellen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert. Danach wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit dem in Blockpuffer verdünnten Primärantikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Zellen mit dem in Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörper in einer abgedunkelten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen im Dunkeln dreimal mit PBS und einmal mit Aqua bidest. gewaschen und mit Mowiol auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop bzw. am konfokalen Mikroskop.

<b>1. Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>2. Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
$\alpha$ -B-Raf	1:200	$\alpha$ -Maus-Cy2 bzw. -Cy3	1:300
$\alpha$ -Hsp70	1:200	$\alpha$ -Maus-Cy2 bzw. -Cy3	1:300
$\alpha$ -Nestin	1:100	$\alpha$ -Maus-Cy3	1:300
$\alpha$ -dbc	1:2000	$\alpha$ -Meerschweinchen-Cy3	1:40
$\alpha$ -NF-M	1 :200	$\alpha$ -Kaninchen-Cy2	1:300
$\alpha$ -O4	1:200	$\alpha$ -Maus-Cy2	1:300
$\alpha$ -GFAP	1:200	$\alpha$ -Maus-Cy3	1:300
$\alpha$ -MAP2	1:1000	$\alpha$ -Kaninchen-Cy2	1:300
$\alpha$ -GR	1:100	$\alpha$ -Kaninchen-Cy2 bzw. -Cy3	1:300
$\alpha$ -P(44/42)-MAPK	1:200	$\alpha$ -Kaninchen-Cy2 bzw. -Cy3	1:300
$\alpha$ -P(S473)-Akt	1:200	$\alpha$ -Kaninchen-Cy2 bzw. -Cy3	1:300
$\alpha$ -Bag-1	1:200	$\alpha$ -Kaninchen-Cy2 bzw. -Cy3	1:300
$\alpha$ -Bag-1	1:100	$\alpha$ -Maus-Cy2 bzw. -Cy3	1:300

**Tabelle 9: Verwendete Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen.**

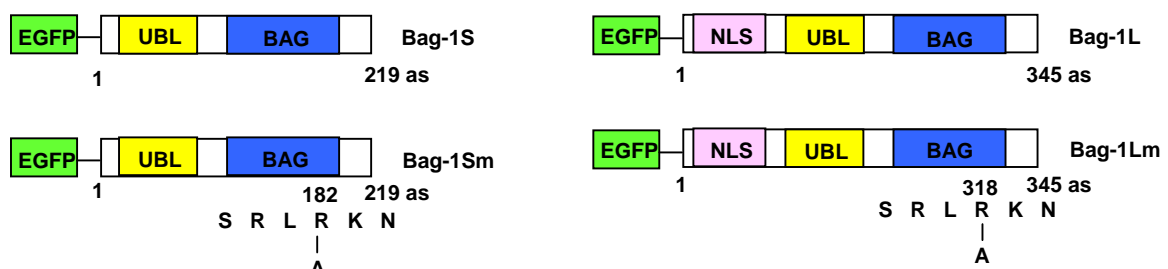


### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Funktionelle Analyse von Bag-1 in PC12 Zellen

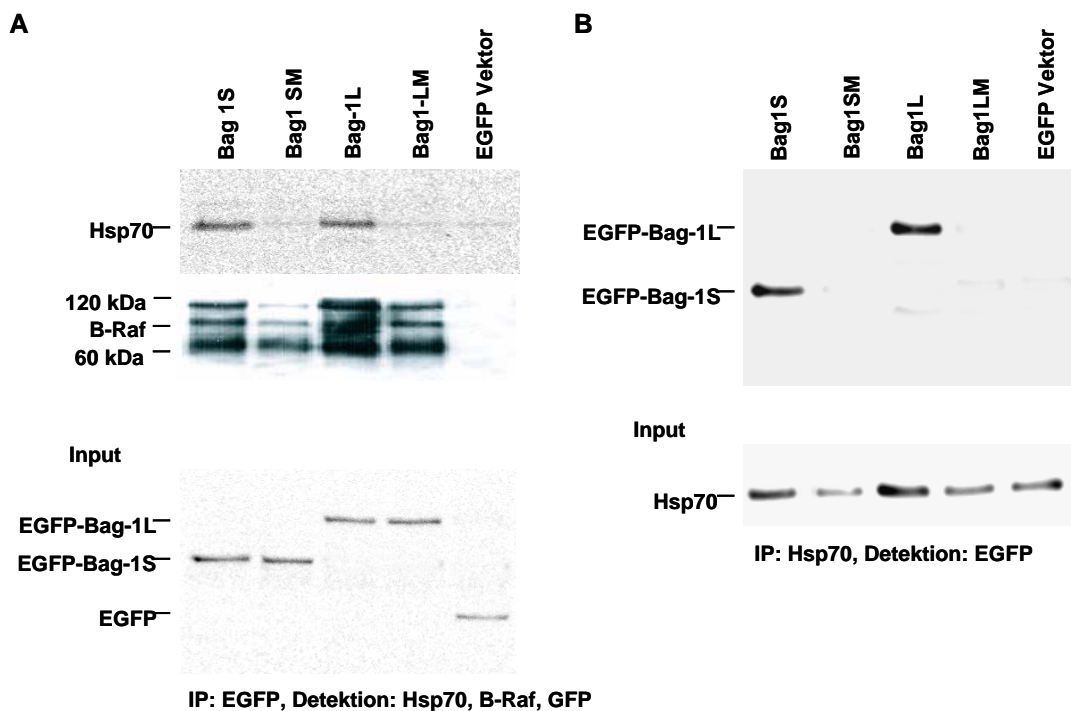
Um die Funktion der Maus-Isoformen Bag-1S und Bag-1L zu untersuchen, wurden beide Proteine zunächst in einer neuronalen Zelllinie aus der Ratte, Phaeochromozytoma Zelllinie 12 (PC12), exprimiert. PC12 Zellen eignen sich als ein *in vitro* Model für neuronale Differenzierung (Greene und Tischler, 1978). Es sollten folgende Fragen geklärt werden: 1. Wie ist die subzelluläre Lokalisation der rekombinanten Proteine in PC12 Zellen? 2. Hat die Überexpression der Bag-1 Isoformen einen Einfluss auf die Differenzierung der PC12 Zellen? 3. Spielt die Interaktion von Bag-1 mit Hsp70 in der Differenzierung eine Rolle? 4. Werden Interaktionspartner von Bag-1 in ihrer Lokalisation durch die Überexpression der rekombinanten Proteine beeinflusst?

Um die beiden Isoformen in eukaryotischen Systemen zu exprimieren, wurden die kodierenden Maus-Sequenzen in den Expressionsvektor pEGFP-C1 kloniert (Abb. 9). Die Interaktion von Bag-1 mit Chaperonen wie Hsp70 wird über die im C-terminalen Bereich liegende Bag-Domäne reguliert. Die elektrostatischen Bindungen erfolgen über die hochkonservierten Reste Glu<sup>212</sup>, Asp<sup>222</sup>, Arg<sup>237</sup> und Gln<sup>245</sup> in dieser Domäne. Mutationen in diesen Resten bewirken eine Abnahme in der Bindung beider Domänen (Sondermann et al., 2001). Es wurde daher eine Punktmutation eingeführt (R182A bei Bag-1S, R318A bei Bag-1L). Die Fusion erfolgte am N-Terminus, um störende sterische Interaktionen mit der C-terminal liegenden Bag-Domäne zu vermeiden (Hohfeld, 1998).



**Abb. 9: Konstruktion der Expressionsvektoren für die Bag-1 Isoformen.** Die cDNA Maus-Sequenzen von Bag-1S und Bag-1L wurden in den pEGFP-C1 Vektor kloniert. Dadurch können die Bag-1 Isoformen als EGFP-Fusionsproteine in eukaryotischen Zelllinien exprimiert werden. Um eine Interaktion von Bag-1 mit Hsp70 zu verhindern, wurde eine Punktmutation in die Bag-1S Sequenz eingeführt (R182A), analog dazu auch in die Bag-1L Sequenz (R318A). EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein; UBL: Ubiquitin-ähnliche Domäne; NLS: Nukleäres Lokalisationssignal, BAG: Bcl2-anthagon-Domäne; as: Aminosäure.

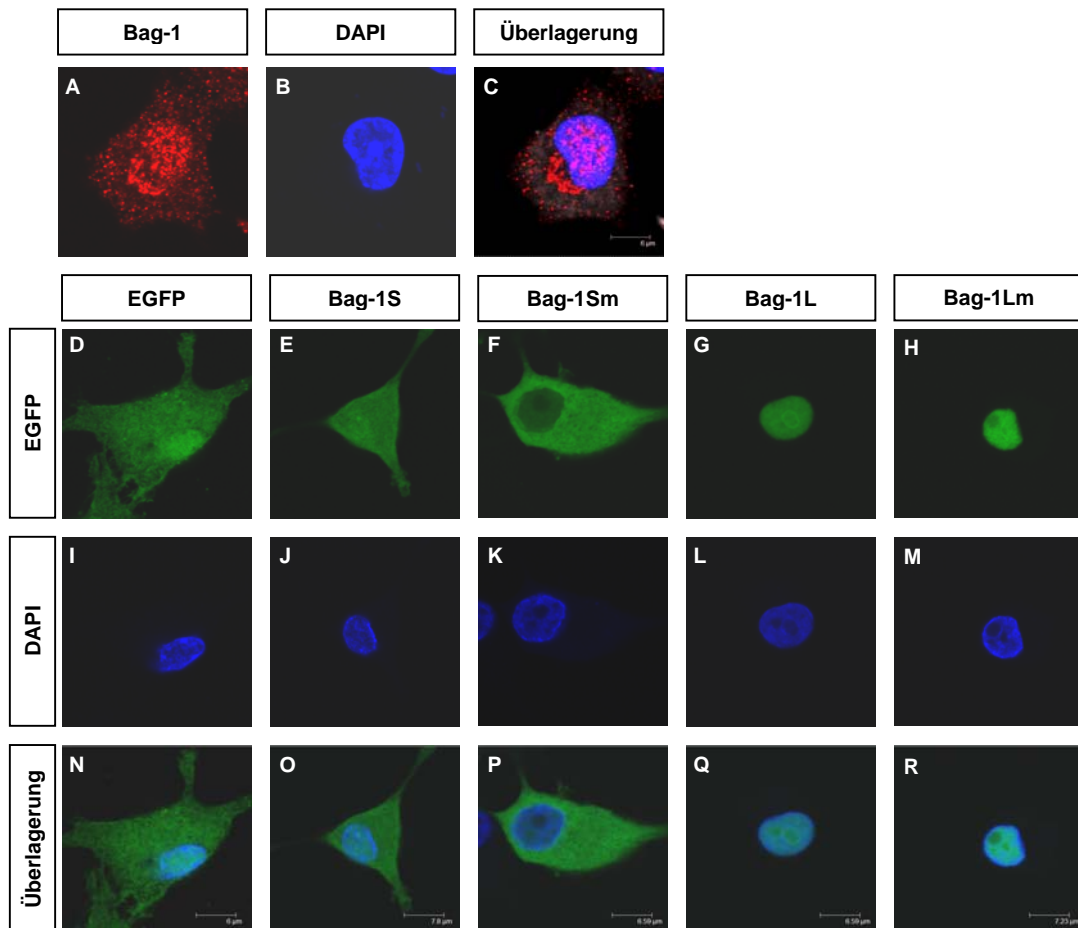
Um die Expression der rekombinanten Proteine zu überprüfen, wurden PC12 Zellen mit den entsprechenden Vektoren transient transfiziert und die Expression mittels Western Blot von Zell-Lysaten analysiert. Die gestörte Interaktion zwischen den Bag-1 Mutanten und Hsp70 wurde über eine Ko-Immunpräzipitation und anschließender Western Blot Analyse nachgewiesen. Alle Fusionsproteine (Abb. 10 A) zeigen die zu erwartenden Molekulargewichte. Ebenso sind die Bag-1 Mutanten nicht mehr in der Lage mit Hsp70 zu interagieren (Abb. 10). Da auch Raf-Kinasen mit Bag-1 über die Bag-Domäne interagieren und deren Aktivität so reguliert werden kann (Wang et al., 1996), musste ausgeschlossen werden, dass die eingeführten Punktmutationen diese Interaktion stören. Nach Durchführung einer weiteren Ko-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass die Interaktion aller Bag-1 rekombinanten Proteine mit der Raf-Kinase B-Raf weiterhin möglich ist (Abb. 10 A).



**Abb. 10: Expression der rekombinanten Proteine in PC12 Zellen.** PC12 Zellen wurden mit den in Abb. 9 dargestellten Plasmiden transient transfiziert und für 48 Stunden in Anwesenheit von NGF inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und Ko-Immunpräzipitationen mit EGFP (A) und Hsp70 (B) durchgeführt. Im Western Blot wurde die Expression von Hsp70, B-Raf (A) und EGFP (B) mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die EGFP-Bag-1 Fusionsproteine werden korrekt in PC12 Zellen exprimiert. Die mutanten Isoformen sind nicht in der Lage mit Hsp70 zu interagieren. Die Interaktion mit B-Raf ist nicht gestört.

### 3.1.1 Subzelluläre Lokalisation der Bag-1 Isoformen

Um die subzelluläre Lokalisation der Bag-1 Maus-Isoformen in eukaryotischen Zellen zu untersuchen, wurden PC12 Zellen mit den unter 3.1 konstruierten Fusionsproteine transient transfiziert. Nach Inkubation mit NGF (EK 50 ng/ml) für 4 Tage wurde die Expression der Isoformen durch die EGFP-Fluoreszenz detektiert.



**Abb 11: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Bag-1S, -1L, -1Sm und -Lm in PC12 Zellen.** PC12 Zellen wurden mit EGFP-Bag-1S, -Bag-1Sm, -Bag-1L und -Bag-1Lm und EGFP als Kontrolle transient transfiziert und für 24 Stunden in Voll-Serum-Medium mit NGF inkubiert. Nach einem Mediumwechsel (Niedrig-Serum-Medium mit NGF) wurde die Differenzierung eingeleitet. Die Expression der Bag-1 Fusionsproteine wurde durch die EGFP Fluoreszenz 96 Stunden nach der Transfektion analysiert (D-H). Die endogene Bag-1 Expression wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen Bag-1 mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen (A). Als nukleärer Marker wurde DAPI verwendet. Es wurden 3 voneinander unabhängige Transfektionen ausgewertet. Maßstab C, N: 6  $\mu$ m, O: 7,5  $\mu$ m, P, Q: 6,59  $\mu$ m, R: 7,23  $\mu$ m.

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde die endogene Expression von Bag-1 in PC12 Zellen nachgewiesen (Abb. 11 A). Bag-1 zeigt eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation. Neben feinen verteilten Anhäufungen im ganzen Zytoplasma,

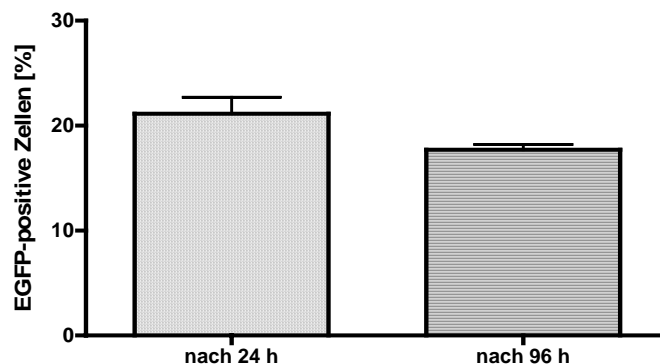
gibt es perinukleär eine größere Anhäufung von Bag-1, die auf eine mitochondriale Lokalisierung schließen lassen (Abb. 11 A). Diese mögliche mitochondriale Lokalisierung von Bag-1 konnte bereits in anderen Zellsystemen nachgewiesen werden (Gotz und Wiese et al., 2005). Die Überexpression von Bag1S zeigt neben der Expression an Mitochondrien auch eine mehr ubiquitäre Expression von Bag-1S. Dies kann durch die Überexpression per se verursacht sein, oder aber auch durch die Fusion mit EGFP. Dass eine Fusion mit EGFP grundsätzlich die Lokalisierung von Bag1 beeinflussen könnte, ist aber eher auszuschließen, da die Expression von Bag1L trotz des angehängten EGFP weiterhin ausschließlich nukleär war (Abb. 11 G). Diese nukleäre Expression von EGFP-Bag-1L hängt damit zusammen, dass Bag-1L ein nukleäres Lokalisationsignal (NLS) besitzt, das Bag-1S fehlt (Zeiner und Gehring, 1995; Packham et al., 1997). Frühere Studien zeigten jedoch, dass Bag-1S mit Hilfe von Transporterproteinen durchaus in der Lage ist, auch in den Zellkern zu gelangen (Zeiner und Gehring, 1995; Takayama et al., 1998; Kullmann et al., 1998). Dies könnte eine Erklärung für die nukleäre Lokalisation von EGFP-Bag-1S sein, welches mit Hilfe von z. B. Hsp70 in den Zellkern transportiert werden könnte. Die Mutante EGFP-Bag-1Lm (Abb. 11 H) weist dieselbe subzelluläre Lokalisation auf, wie die Wildtyp-Isoform EGFP-Bag-1L (Abb. 11 G). EGFP-Bag-1Sm zeigt jedoch im Vergleich zu EGFP-Bag-1S in vielen Zellen ein schwaches nukleäres Signal (Abb. 11 F), was vermutlich auf die fehlende Interaktion mit Hsp70 zurückzuführen ist, welches eines der möglichen Transporterproteine ist, um Bag-1S in den Zellkern zu transportieren.

### **3.1.2 Analyse der Bag-1 Isoformen in der Differenzierung von PC12 Zellen**

Da Bag-1 als ein multifunktionales Molekül auch einen Einfluss auf die neuronale Entwicklung nehmen könnte und in anderen Zelllinien gezeigt werden konnte, dass Bag-1 Neuritenwachstum fördert (Kermer et al., 2002; Liman et al., 2005; Gotz und Wiese et al., 2005), sollte dieses anhand von PC12 Zellen analysiert werden.

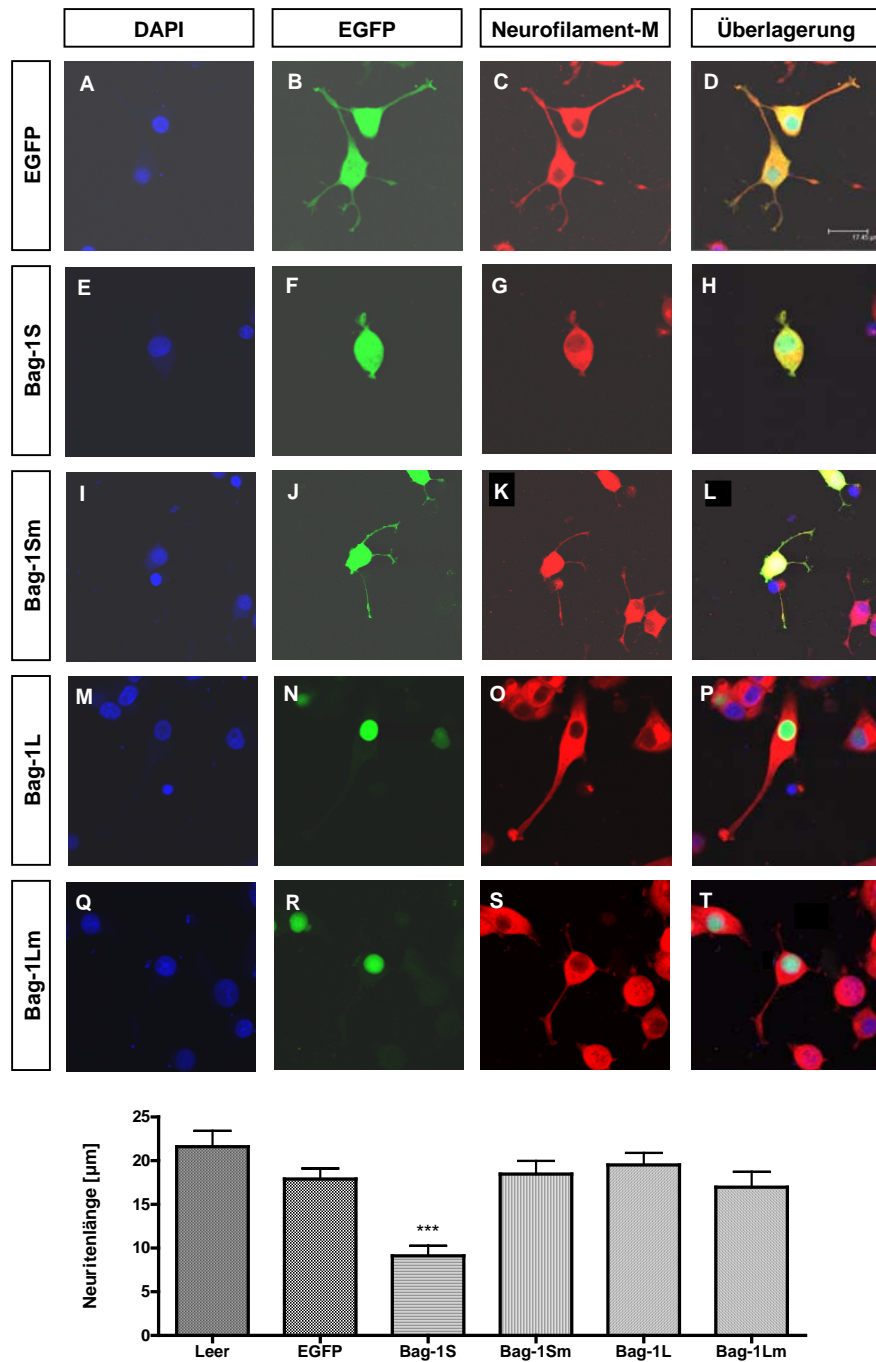
PC12 Zellen wurden mit den verschiedenen Fusionsproteinen von Bag-1 transient transfiziert. Dabei wurden die Zellen für 24 Stunden mit NGF (EK 50 ng/ml) im Voll-Serum-Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Differenzierung mit NGF (EK 50 ng/ml) für 3 weitere Tage durch Niedrig-Serum-Medium. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um ein ausreichendes Neuritenwachstum der Zellen analysieren zu können.

Um auszuschließen, dass bei der transienten Transfektion nach einem Zeitraum von 4 Tagen die Expression der rekombinanten Proteine abnimmt, wurde nach 24 Stunden und nach 96 Stunden, also dem Zeitpunkt der Analyse der Neuriten, die Transfektionsrate von EGFP-positiven Zellen bestimmt (Abb. 12). Es wurden mindestens 100 EGFP-positive Zellen pro Experiment ausgewertet. 24 Stunden nach der Transfektion waren  $(21,13 \pm 1,6)$  % der Zellen EGFP-positiv, nach 96 Stunden waren es  $(17,7 \pm 0,5)$  %. Dieser Unterschied ist nicht signifikant, so dass auch 96 Stunden nach Transfektion noch eine ausreichende Anzahl transfizierter Zellen für die nachfolgenden Analysen vorhanden ist.



**Abb. 12: Die Überexpression von EGFP ändert sich über einen Zeitraum von 4 Tagen nicht signifikant.** PC12 Zellen wurden mit pEGFP-C1 transient transfiziert und für 24 Stunden in Voll-Serum-Medium mit NGF inkubiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung von EGFP-positiven Zellen der pEGFP-C1 Transfektion. Nach einem Mediumwechsel (Niedrig-Serum-Medium mit NGF) wurde die Differenzierung eingeleitet und 96 Stunden nach der Transfektion erneut die Anzahl EGFP-positiver Zellen bestimmt. Nach 24 Stunden waren  $(21,13 \pm 1,6)$  % EGFP-positive Zellen vorhanden, nach 96 Stunden  $(17,7 \pm 0,5)$  %. Es wurden 3 voneinander unabhängige Transfektionen ausgewertet.

Um das Neuritenwachstum zu analysieren, wurden diese mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Antikörper  $\alpha$ -Neurofilament-M sichtbar gemacht. Neurofilamente sind Bestandteil des Zytoskeletts. Die M-Neurofilamente bezeichnen die Neurofilamente mit einem mittleren Gewicht (Alberts et al., 1994). Die Messung der Neuritenlänge erfolgte mit Scion Image. Es wurden 3 voneinander unabhängige Transfektionen ausgewertet, pro Plasmid wurde mindestens 50 transient transfizierte Zellen ausgewertet.



**Abb. 13: Die Überexpression von Bag-1S führt zu einer Reduktion des Neuritenwachstums in PC12 Zellen.** PC12 Zellen wurden mit EGFP-Bag-1S, -Bag-1Sm, -Bag-1L und -Bag-1Lm und EGFP als Kontrolle transient transfiziert und für 24 Stunden in Voll-Serum-Medium mit NGF inkubiert. Nach einem Mediumwechsel (Niedrig-Serum-Medium mit NGF) wurde die Differenzierung für weitere 72 Stunden eingeleitet. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurden die Neuriten mittels des Neuritenmarkers Neurofilament-M sichtbar gemacht. Als nukleärer Marker diente DAPI. Anschließend wurden die Neuriten mit dem Programm Scion Image vermessen. Es wurden 3 voneinander unabhängige Transfektionen ausgewertet ( $P < 0.001$ ). Maßstab 17,45 µm.

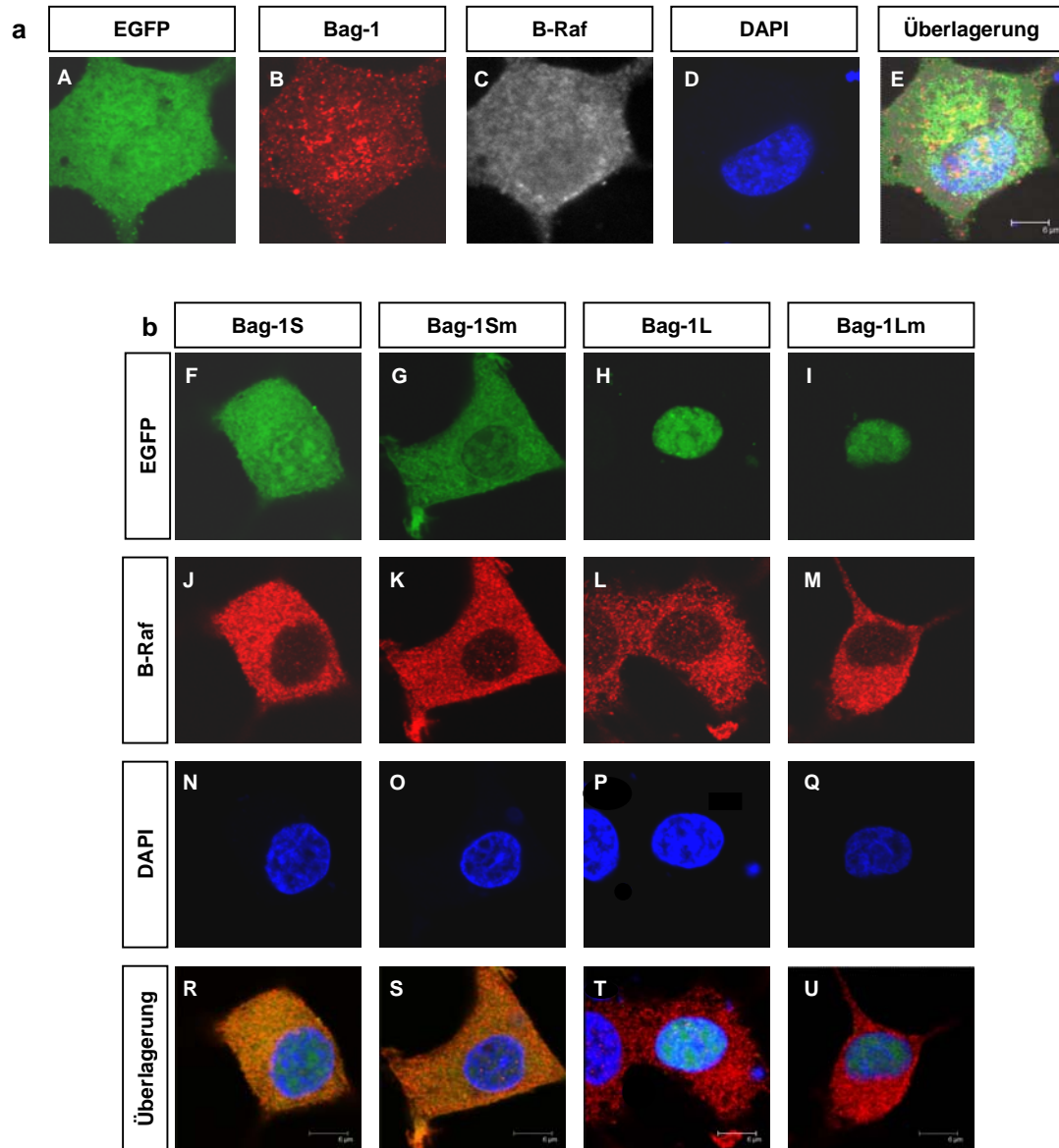
EGFP-transfizierte Zellen hatten nach 96 Stunden eine durchschnittliche Länge von  $(17,9 \pm 1,2)$   $\mu\text{m}$ , nicht-transfizierte Zellen dagegen eine durchschnittliche Länge von  $(21,59 \pm 1,89)$   $\mu\text{m}$ . EGFP alleine führte bereits dazu, dass die Neuritenlänge sich leicht verringert, dieser Einfluss ist aber nicht signifikant (Abb. 13). Die Überexpression von EGFP-Bag-1S allerdings verringerte die Neuritenlänge auf  $(9,1 \pm 1,6)$   $\mu\text{m}$ . Dieser Unterschied ist signifikant im Vergleich zur Neuritenlänge von EGFP-transfizierten und nicht-transfizierten Zellen ( $P < 0,001$ ) (Abb. 13). Eine Überexpression von EGFP-Bag-1L hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Neuritenwachstum. Die Neuriten erreichten im Durchschnitt eine Länge von  $(19,5 \pm 1,3)$   $\mu\text{m}$  (Abb.13). Die Analyse des Neuritenwachstums von EGFP-Bag-1Sm positiven Zellen ergab ähnlich wie bei EGFP-Bag-1L eine durchschnittliche Neuritenlänge von  $(19,5 \pm 1,3)$   $\mu\text{m}$ . EGFP-Bag-1Lm positive Zellen wiesen im Durchschnitt eine Neuritenlänge von  $(16,9 \pm 1,7)$   $\mu\text{m}$  auf, der ebenso nicht signifikant ist im Vergleich mit der durchschnittlichen Neuritenlänge der beiden Kontrollen EGFP-positiver Zellen und nicht-transfizierten Zellen (Abb. 13). Demnach führt nur die Überexpression von EGFP-Bag-1S zu einer signifikanten Reduktion des Neuritenwachstums. Da die Überexpression von EGFP-Bag-1Sm nicht zu diesem Effekt führt, besteht die Möglichkeit, dass auch Hsp70 eine Rolle im Neuritenwachstum von PC12 Zellen spielt.

### **3.1.3 Subzelluläre Analyse der Signalmoleküle B-Raf, Hsp70, Akt und MAPK**

NGF führt über TrkA zur Aktivierung des Ras/Raf/MAPK- und des PI3-K/Akt-Signalwegs, was die Phosphorylierung von Akt, und den MAP-Kinasen zur Folge hat (Hemmings, 1997; Kolch, 2000; Chang et al., 2003). Weitere Moleküle, die in diesem Signalweg involviert sind, sind Hsp70 und B-Raf. Da Bag-1 auch in PC12 Zellen in einem Komplex aus Akt, Hsp70 und B-Raf vorliegt (Jablonka et al., 2004) und eine Überexpression von Bag-1S in PC12 Zellen das Neuritenwachstum inhibiert, war eine Analyse der genannten Proteine notwendig.

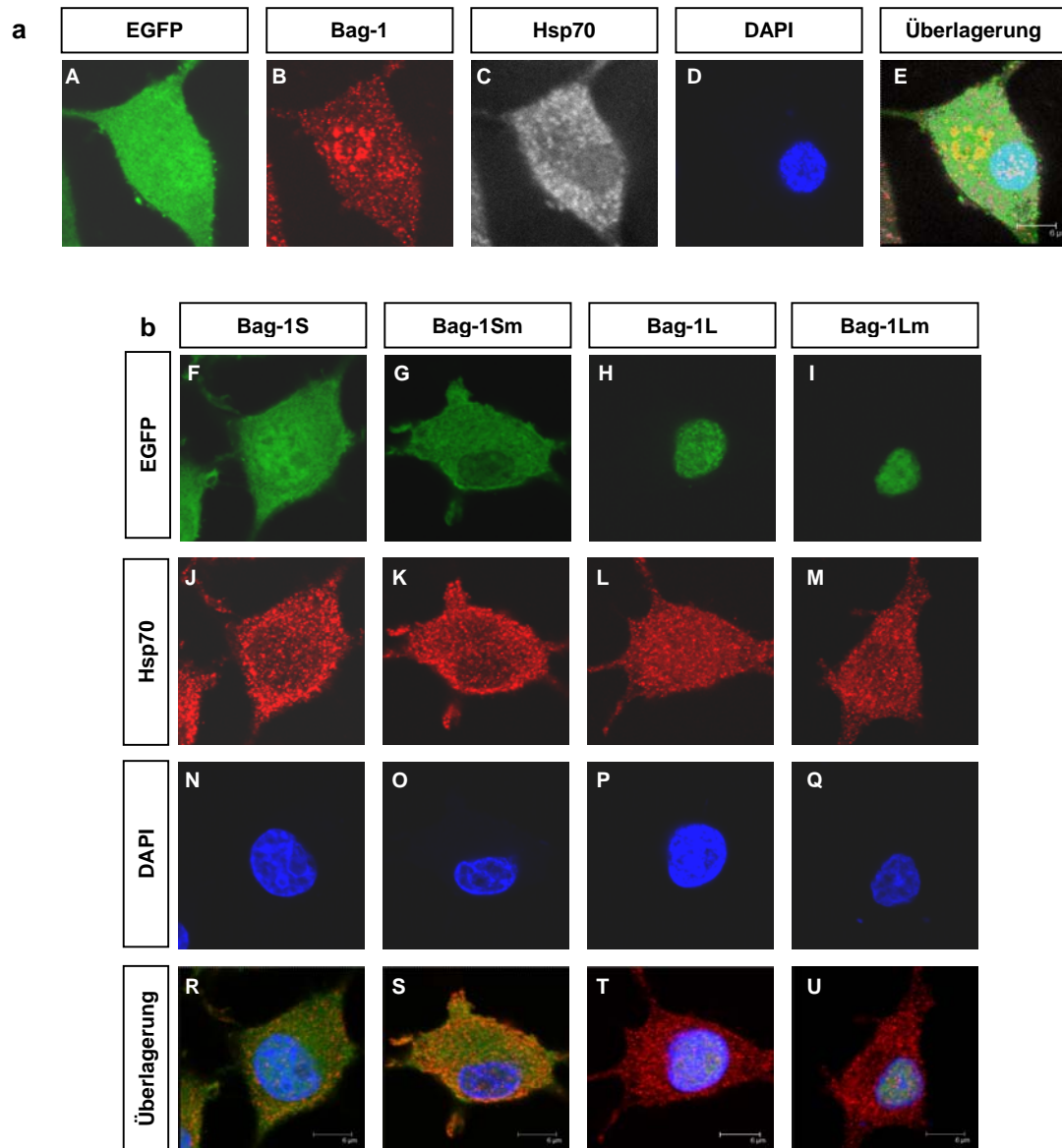
Da bei der transienten Transfektion nach 24 Stunden lediglich eine Transfektionsrate von  $(21,13 \pm 1,6)$  % erreicht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Einfluss der transfizierten Zellen auf die Phosphorylierung zu gering ist, um einen Effekt durch die Überexpression der Bag-1 Konstrukte anhand einer Western Blot

Analyse nachzuweisen. Daher wurden transient transfizierte differenzierte PC12 Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen B-Raf, Hsp70, Akt-P(S473) und MAPK-P(44/42) analysiert.

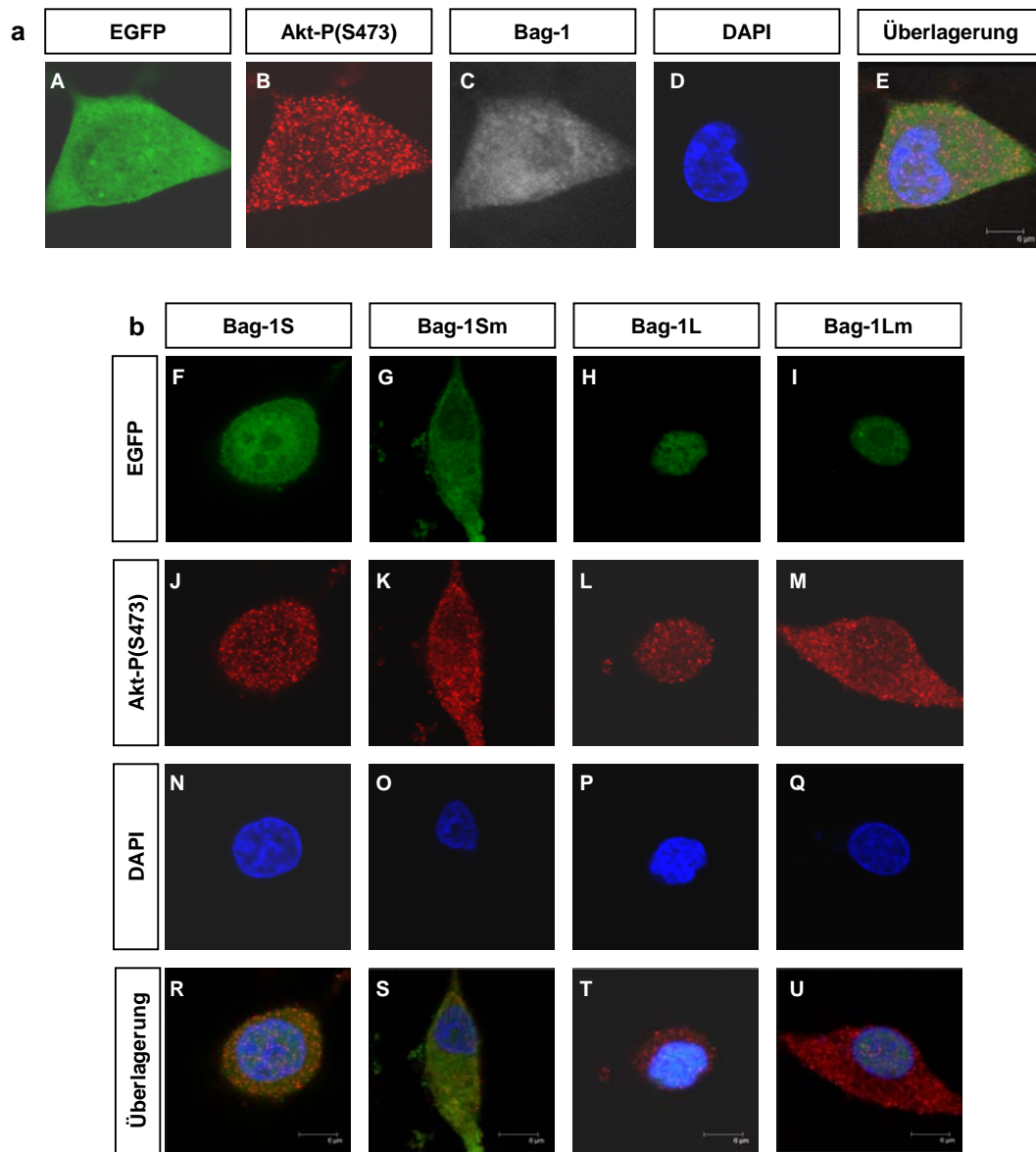


**Abb. 14: Subzelluläre Lokalisation von Bag-1 und B-Raf.** PC12 Zellen wurden mit EGFP-Bag-1S, -Bag-1Sm, -Bag-1L und -Bag-1Lm (b) und EGFP (a) als Kontrolle transient transfiziert und für 24 Stunden in Voll-Serum-Medium mit NGF inkubiert. Nach einem Mediumwechsel (Niedrig-Serum-Medium mit NGF) wurde für weitere 72 Stunden die Differenzierung eingeleitet. Nach Fixierung der Zellen wurde die Expression von B-Raf mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Als nukleärer Marker wurde DAPI verwendet. Es wurden 3 voneinander unabhängige Transfektionen durchgeführt. Maßstab 6 µm.

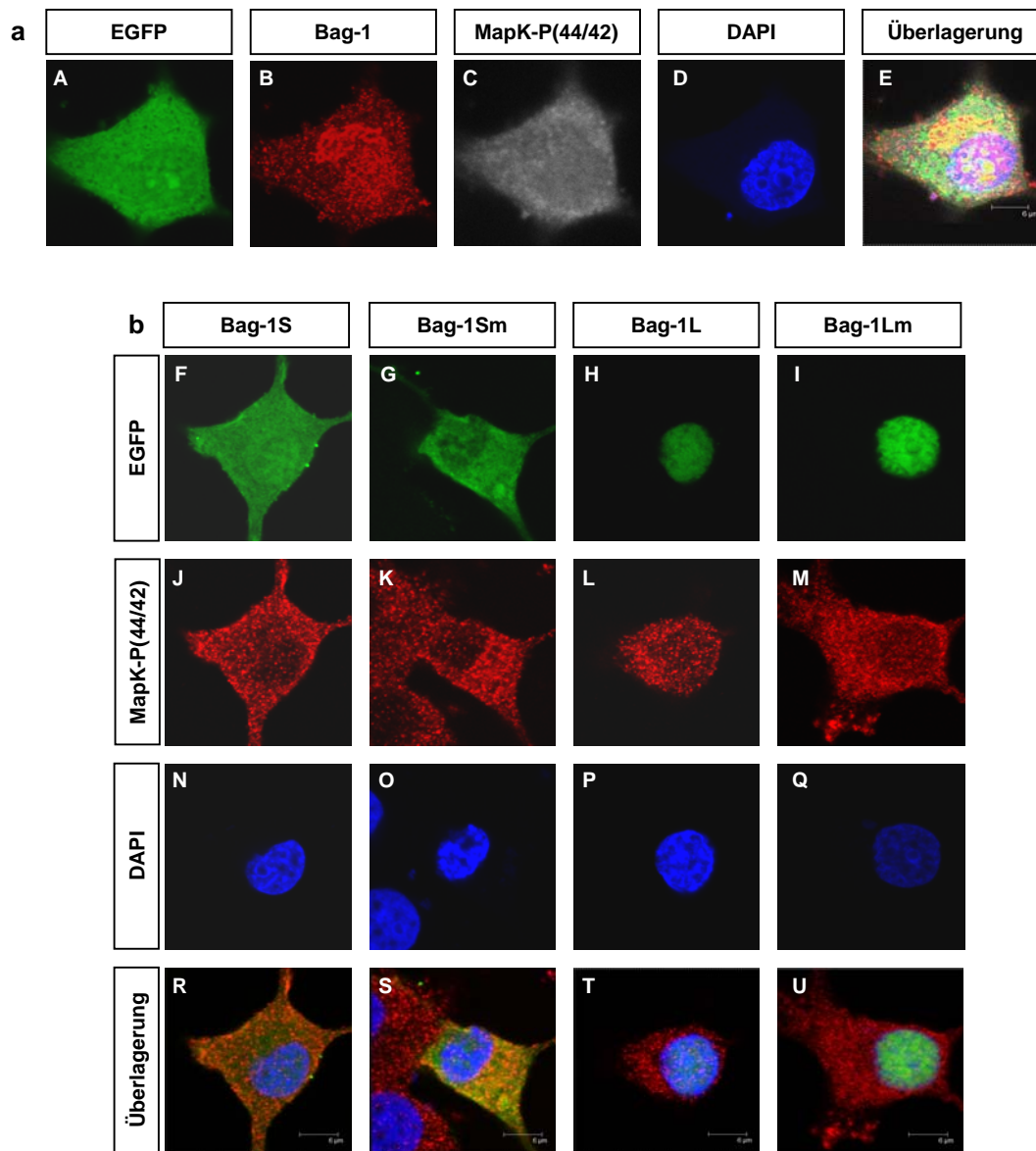




**Abb. 15: Subzelluläre Lokalisation von Bag-1 und Hsp70.** PC12 Zellen wurden mit EGFP-Bag-1S, -Bag-1Sm, -Bag-1L und -Bag-1Lm (b) und EGFP (a) als Kontrolle transient transfiziert und für 24 Stunden in Voll-Serum-Medium mit NGF inkubiert. Nach einem Mediumwechsel (Niedrig-Serum-Medium mit NGF) wurde für weitere 72 Stunden die Differenzierung eingeleitet. Nach Fixierung der Zellen wurde die Expression von Hsp70 mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Als nukleärer Marker wurde DAPI verwendet. Es wurden 3 voneinander unabhängige Transfektionen durchgeführt. Maßstab 6  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 16: Subzelluläre Lokalisation von Bag-1 und Akt.** PC12 Zellen wurden mit EGFP-Bag-1S, -Bag-1Sm, -Bag-1L und -Bag-1Lm (B) und EGFP (A) als Kontrolle transient transfiziert und für 24 Stunden in Voll-Serum-Medium mit NGF inkubiert. Nach einem Mediumwechsel (Niedrig-Serum-Medium mit NGF) wurde für weitere 72 Stunden die Differenzierung eingeleitet. Nach Fixierung der Zellen wurde die Expression von Akt-P(S473) mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Als nukleärer Marker wurde DAPI verwendet. Es wurden 3 voneinander unabhängige Transfektionen durchgeführt. Maßstab R, S, T, U: 6 µm.



**Abb. 17: Subzelluläre Lokalisation von Bag-1 und MAPK-P(44/42).** PC12 Zellen wurden mit EGFP-Bag-1S, -Bag-1Sm, -Bag-1L und -Bag-1Lm (b) und EGFP (a) als Kontrolle transient transfiziert und für 24 Stunden in Voll-Serum-Medium mit NGF inkubiert. Nach einem Mediumwechsel (Niedrig-Serum-Medium mit NGF) wurde für weitere 72 Stunden die Differenzierung eingeleitet. Nach Fixierung der Zellen wurde die Expression von MAPK-P(44/42) mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Als nukleärer Marker wurde DAPI verwendet. Es wurden 3 voneinander unabhängige Transfektionen durchgeführt. Maßstab 6  $\mu$ m.

B-Raf ist in PC12 Zellen diffus und in einigen wenigen lokalen Anhäufungen im Zytoplasma verteilt (Abb. 14 C). Eine Kolokalisation mit endogenem Bag-1 ist gegeben (Abb. 14 E), aber aufgrund der diffusen Lokalisation von B-Raf konnten zelluläre Strukturen nicht näher analysiert werden. Die Überexpression der rekomb-

binanten Bag-1 Proteine hat keinen Einfluss auf die B-Raf Lokalisation, EGFP-Bag-1L und -Lm sind aufgrund ihrer nukleären Lokalisation nicht mit B-Raf kolokalisiert (Abb. 14 b). Hsp70 ist in PC12 Zellen vorwiegend im Zytoplasma in Anhäufungen lokalisiert. In einigen Zellen können diese Anhäufungen auch im Zellkern beobachtet werden. Teilweise sind diese zytoplasmatischen und nukleären Anhäufungen mit endogenem Bag-1 kolokalisiert (Abb. 15 B, C, E). Die Überexpression von EGFP-Bag-1S und -1Sm hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Hsp70. Hsp70 wird auch hier vorwiegend im Zytoplasma und teilweise auch im Zellkern exprimiert (Abb. 15 F, G, J, K). Dagegen zeigen Zellen, die EGFP-Bag-1L exprimierten, ein stärkeres nukleäres Signal für Hsp70 (Abb. 15 L). Exprimierten Zelle dagegen EGFP-Bag-1Lm ist Hsp70 wieder primär im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 15 M). Da die Überexpression von EGFP-Bag-1L und -Lm keinen signifikanten Einfluss auf das Neuritenwachstum hatte, spielt diese Änderung in der subzellulären Lokalisation von Hsp70 aus dem Zytoplasma in den Zellkern durch Bag-1L keine Rolle. Akt-P(S473) ist im Zytoplasma in mehreren Anhäufungen lokalisiert, im Zellkern ist nur ein schwaches Signal zu sehen (Abb. 16 B). Ebenso besteht eine Kolokalisation mit endogenem Bag-1 (Abb. 16 B, C, E). Auf die subzelluläre Lokalisation und Fluoreszenzintensität von Akt-P(S473) hat die Überexpression der rekombinanten Bag-1 Proteine keinen Einfluss (Abb. 16 B, J-M). MAPK-P(44/42) war ähnlich wie Akt-P(S473) als feine Anhäufungen im Zytoplasma lokalisiert, im Zellkern nur schwach (Abb. 17 C). Ebenso war eine Kolokalisation mit endogenem Bag-1 an einigen zellulären Strukturen zu beobachten (Abb. 17 B, C, E). Jedoch sind auch hier keine Änderungen der subzellulären Lokalisation und Fluoreszenzintensität von MAPK-P(44/42) durch die Überexpression von EGFP-Bag-1S, -Sm, -L und -Lm zu beobachten (Abb. 17 B, J-M). Da durch NGF Akt und MAPK phosphoryliert werden, hätte ein mögliche Zu- oder Abnahme der Phosphorylierung beider Proteine einen Hinweis auf die Involvierung von Bag-1 in den jeweiligen Signalweg geben können. Demnach scheint der Einfluss von Bag-1S auf das Neuritenwachstum über andere Signalmoleküle zu gehen, die noch charakterisiert werden müssen.

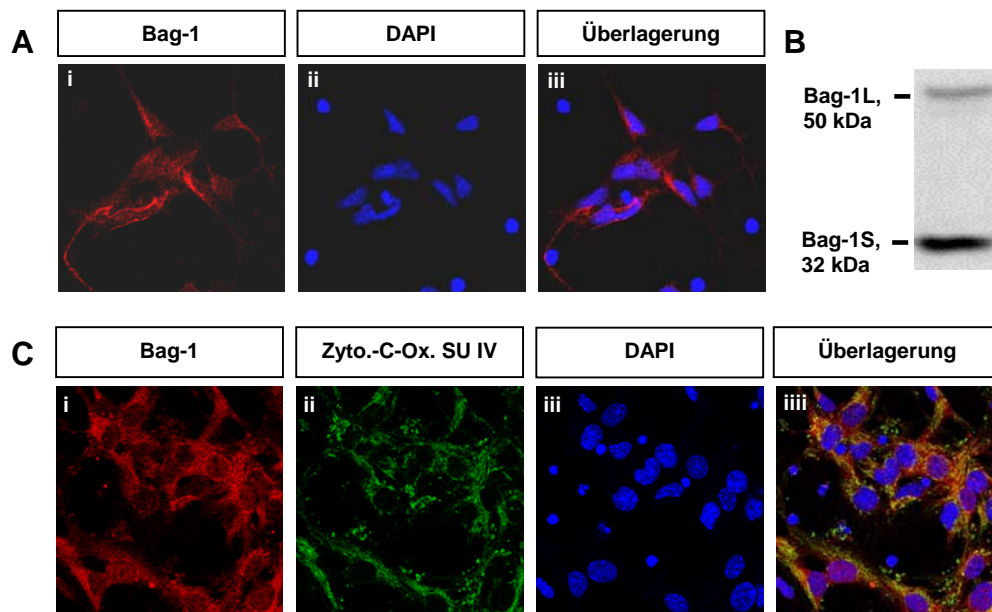
## 3.2 Funktionelle Analyse von Bag-1 in Neuralen Stammzellen

Ein weiteres in vitro Modell zur Analyse neuronaler Differenzierung sind Neuronale Stammzellen, die mit Faktoren proliferieren und ohne, sich in Neurone, Astrocyten und Oligodendrocyten differenzieren (Temple, 2001). Da bereits ein Einfluss von Bag-1 in der Differenzierung von PC12 Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte nun anhand Neuraler Stammzellen, die defizient für Bag-1 sind, die Funktion von Bag-1 in der neuronalen Differenzierung näher analysiert werden. Dabei sollte geklärt werden, ob das Fehlen von Bag-1 einen Einfluss auf das Überleben und die Differenzierung von Neuralen Stammzellen hat. Des Weiteren wurde analysiert welche Bag-1 Maus-Isoform in diese Prozesse involviert ist und ob die Interaktion von Hsp70 mit Bag-1 eine Rolle spielt.

### 3.2.1 Expressionsanalyse von Bag-1 in Neuralen Stammzellen

Eine erste Charakterisierung der Funktion von Bag-1 erfolgte durch Expressionsanalyse von E11.5 *Bag-1* +/- Neuralen Stammzellen. Dabei wurde den Neuralen Stammzellen die Wachstumsfaktoren bFGF und mEGF entzogen und so die Differenzierung eingeleitet. Die Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert. Ebenso wurde die endogene Expression von Bag-1 in *Bag-1* +/- Neuronale Stammzellen durch indirekte Immunfluoreszenz mittels eines spezifischen Bag-1 Antikörper sichtbar gemacht.

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt ein starkes zytoplasmatisches und ein sehr schwaches nukleäres Signal, welches sich auf kleine Regionen im Zellkern beschränkt (Abb. 18 A i). Des Weiteren ist Bag-1 nicht gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, sondern bildet sehr feine lokale und größere Anhäufungen. Diese Expression deckt sich mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse, die zeigt dass primär die zytoplasmatische Bag-1S Isoform exprimiert wurde. Das nukleäre Bag-1L wurde ebenfalls exprimiert, jedoch wesentlich schwächer als Bag-1S (Abb. 18 B). Eine zusätzliche Färbung mit dem Antikörper  $\alpha$ -Cytochrom-C-Oxidase Subunit IV, der spezifisch eine Untereinheit der Cytochrom-C-Oxidase markiert, ein Bestandteil der Mitochondrienmembran (Alberts et al., 1994), konnte eine Kolo-kalisation mit Bag-1 gezeigt werden (Abb. 18 C i-iii).

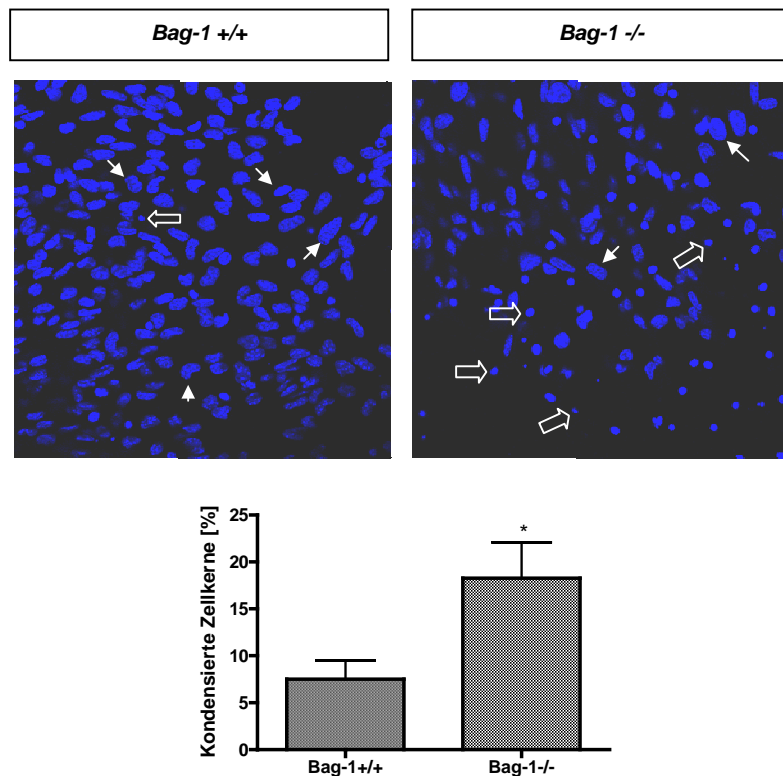


**Abb. 18: Endogene Expression von Bag-1 in *Bag-1* +/+ Neuralen Stammzellen.** *Bag-1* +/+ Neuronale Stammzellen wurden an E11.5 präpariert und für 4–5 Tage mit Wachstumsfaktoren in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie ohne Faktoren für Immunfluoreszenzfärbungen auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen, für Western Blot Analysen auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Schalen differenziert. Die Analyse erfolgte nach 24 Stunden. A: Immunfluoreszenzfärbungen zeigen ein starkes zytoplasmatisches und ein sehr schwaches nukleäres Bag-1 Signal in *Bag-1* +/+ Neuralen Stammzellen (i). B: Der Western Blot zeigt, dass Bag-1S die primär exprimierte Bag-1 Isoform in Neuralen Stammzellen ist, Bag-1L wird nur sehr schwach exprimiert. C: Die Färbung von Mitochondrien mit einem spezifischen Antikörper gegen die Cytochrome-C-Oxidase Subunit IV (ii) zeigt, dass Bag-1 (i) mit Mitochondrien kolokalisiert ist (iiii). DAPI wurde als nukleärer Marker verwendet. Es wurden jeweils 3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

### 3.2.2 Analyse von *Bag-1* -/- Neuralen Stammzellen

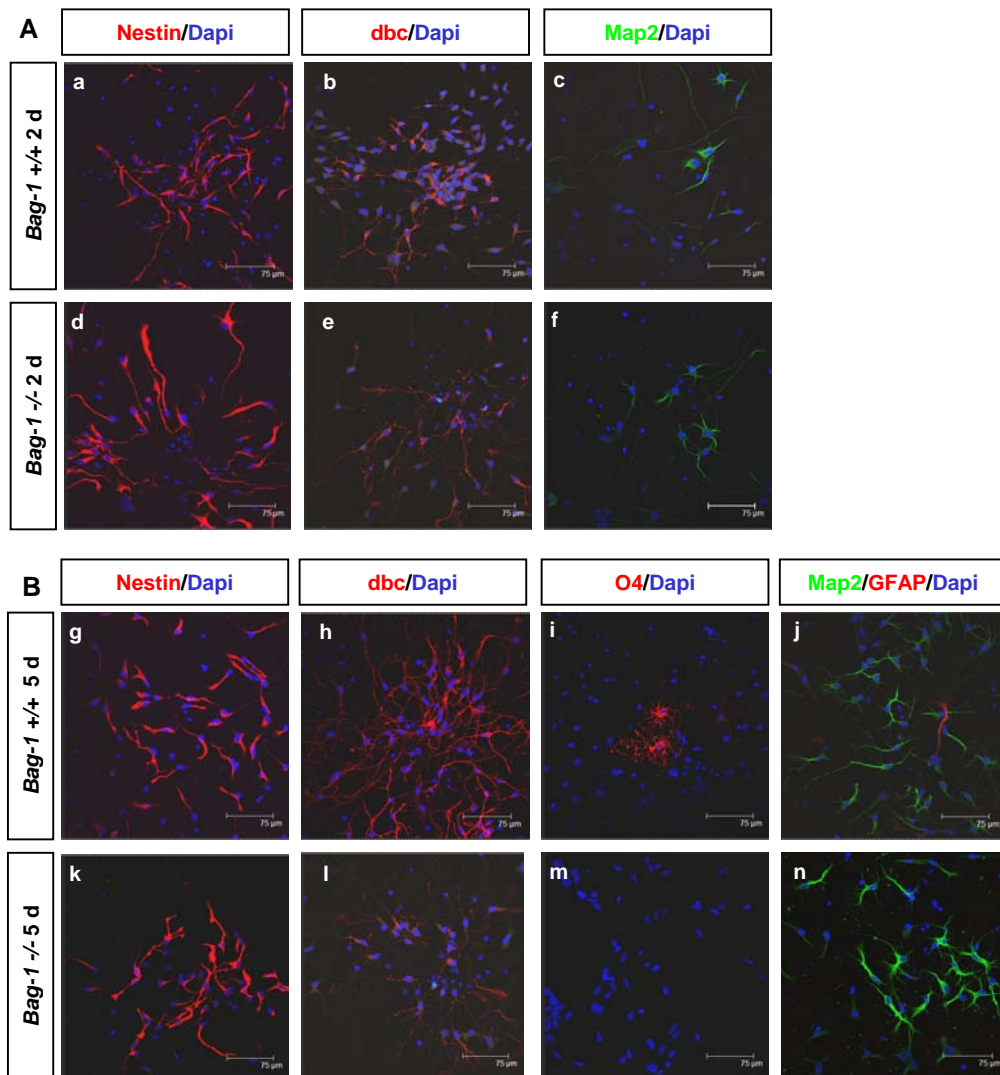
*Bag-1* -/- Mäuse sterben bereits um E13. Bisherige Analysen ergaben, dass diese Embryonen erhöhte Apoptose in der Leber und in dem sich entwickelnden Nervensystem des Vorderhirns aufweisen (Gotz und Wiese et al., 2005). Es galt zu klären, welche Zelltypen vermehrt absterben und welche Bag-1 Isoform wichtig für das Überleben und die Differenzierung Neuraler Stammzellen ist. Daher wurden Neuronale Stammzellen von *Bag-1* +/+ und *Bag-1* -/- Embryonen an E11.5 präpariert, differenziert und die Apoptoseraten sowie die Differenzierung in Neurone, Astrocyten und Oligodendrocyten ausgewertet. *Bag-1* +/+ und *Bag-1* -/- Neuronale Stammzellen wurden durch Entzug der Wachstumsfaktoren bFGF und mEGF differenziert und zu verschiedenen Zeitpunkten durch indirekte Immunfluoreszenz mittels spezifischer Antikörper analysiert. Um eine Aussage über die Apoptose treffen zu können, wurden die Zellkerne mit DAPI markiert und der Anteil kondensierter Zellkerne nach 24

Stunden quantifiziert, die ein Maß für stattgefundene Apoptose sind (Abb. 19). Es wurden mindestens 500 Zellkerne ausgewertet. Nach 24 Stunden Differenzierung betrug der Anteil kondensierter Zellkerne von *Bag-1* *+/+* Neuralen Stammzellen ( $7,5 \pm 2$ ) %, *Bag-1* *-/-* Neurale Stammzellen hatten ( $18,25 \pm 3,8$ ) % kondensierte Zellkerne (Abb. 19). Dieser signifikante Unterschied zeigt, dass *Bag-1* *-/-* Neurale Stammzellen eine erhöhte Apoptose erfahren ( $P < 0,05$ ).



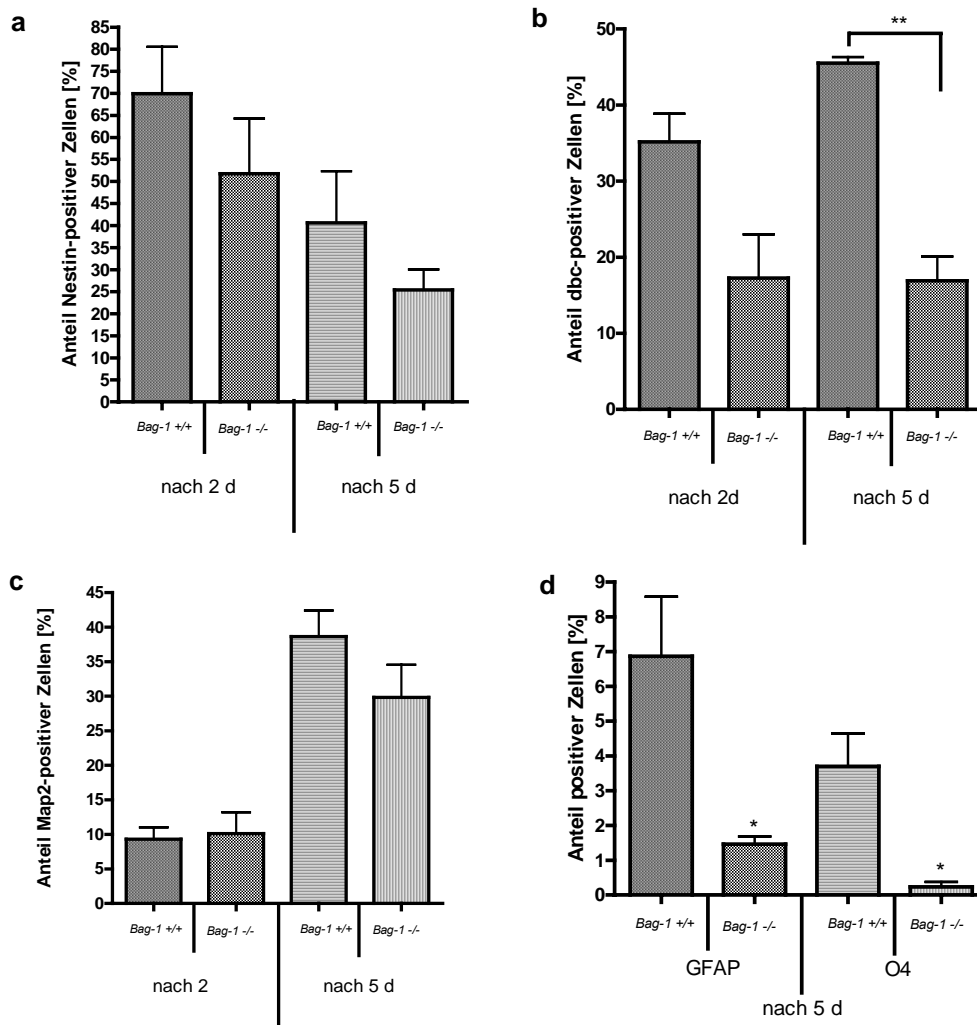
**Abb. 19: *Bag-1* *-/-* Neurale Stammzellen weisen eine erhöhte Apoptose auf.** *Bag-1* *+/+* und *Bag-1* *-/-* Neurale Stammzellen wurden E11.5 präpariert und für 2–3 Tage mit Wachstumsfaktoren in Kultur gehalten. Die anschließende Differenzierung erfolgte durch Entzug der Faktoren auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI markiert. A: Immunfluoreszenzaufnahmen von *Bag-1* *+/+* und *Bag-1* *-/-* Neuralen Stammzellen nach 24 Stunden Differenzierung. ↑ Intakter Zellkern, ↑ kondensierter Zellkern. B: Quantifizierung kondensierter Zellkerne. Es wurden 3 voneinander unabhängige Experimente ausgewertet ( $P < 0,05$ ).

Zur Analyse der Differenzierung von Neuralen Stammzellen wurden Antikörper gegen spezifische Marker-Proteine verwendet: Nestin als Marker für Neurale Stammzellen, doublecortin (dbc) als Marker für frühe postmitotische Neurone, Microtubule-associated-protein 2 (Map2) als Marker für Neurone, O4 als Marker für frühe Oligodendrocyten und Gliary Fibrillaric Acid Protein (GFAP) als Marker für Astrocyten. Es wurden mindestens 500 Zellen pro Experiment ausgewertet.



**Abb. 20: *Bag-1*  $-/-$  Neurale Stammzellen differenzieren sich nicht in Astrocyten und Oligodendrocyten.** Neurale Stammzellen wurden an E11.5 präpariert und 2-3 Tage in Kultur mit Wachstumsfaktoren gehalten. Die Differenzierung erfolgte durch Entzug der Faktoren auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichteten Deckgläsern. Nach 2 und nach 5 Tagen wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. A: Nach 2 Tagen Differenzierung waren sowohl *Bag-1*  $+/+$  als auch *Bag-1*  $-/-$  Neurale Stammzellen Nestin-, dbc- und Map2-positiv (a-f). B: Am fünften Tag der Differenzierung waren *Bag-1*  $+/+$  Neurale Stammzellen auch noch GFAP- und O4-positiv (i, j), jedoch nicht *Bag-1*  $-/-$  Neurale Stammzellen (m, n). Nestin: Neuraler Stammzellen Marker; doublecortin (dbc): Marker für frühe postmitotische Neurone; Microtubule-associated-protein 2 (Map2): Neuronaler Marker; Gliary Fibrillaric Acid Protein (GFAP): Astrocyten Marker; O4: Marker für frühreife Oligodendrocyten; DAPI: nukleärer Marker. Maßstab 75 µm.



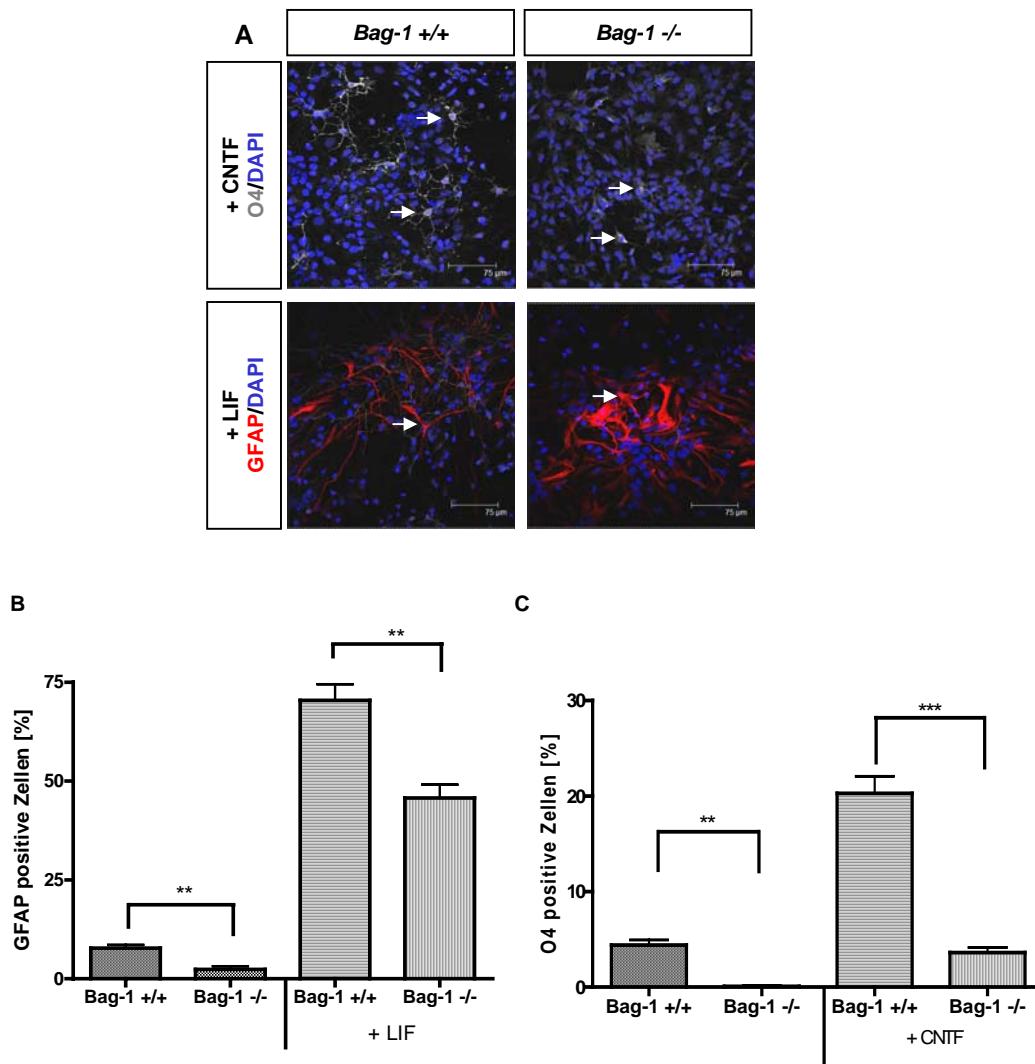


**Abb. 21: Quantifizierung von Nestin-, dbc-, Map2-, GFAP- und O4-positiven Zellen.** Neurale Stammzellen wurden an E11.5 präpariert und 2–3 Tage in Kultur mit Wachstumsfaktoren gehalten. Die Differenzierung erfolgte durch Entzug der Faktoren auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichteten Deckgläsern. Nach 2 und nach 5 Tagen wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Es wurden 3 voneinander unabhängige Experimente ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte nach 2 und nach 5 Tagen, bei GFAP- und O4-positiven Zellen nur nach 5 Tagen. Nestin: Neuraler Stammzellen Marker; doublecortin (dbc): Marker für frühe postmitotische Neurone; Microtubule-associated-protein 2 (Map2): Neuronaler Marker; Gliary Fibrillaric Acid Protein (GFAP): Astrocyten Marker; O4: Marker für frühreife Oligodendrocyten.  $P < 0,05$ .

*Bag-1 +/+* Neurale Stammzellen waren nach 2 Tagen zu  $(69,9 \pm 10,6)$  % Nestin-positiv, *Bag-1 -/-* Neurale Stammzellen dagegen nur zu  $(51,8 \pm 12,5)$  % (Abb. 20 a, d, 21 a). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Ebenso zeigte die Differenzierung in Neurone nach 2 Tagen keinen Unterschied zwischen beiden Genotypen (Abb. 20 c, f, 21 c) (Map2-positiv: *Bag-1 +/+*  $(9,3 \pm 1,7)$  %, *Bag-1 -/-*  $(10,1 \pm 3,1)$  %). Allerdings wiesen *Bag-1 +/+* Neurale Stammzellen nach 2 Tagen  $(35,1 \pm 3,7)$  % positive dbc-Zellen auf, *Bag-1 -/-* Neurale Stammzellen nur  $(17,3 \pm 5,8)$  % (Abb. 20 b,

e, 21 b). Jedoch war auch dieser Unterschied nicht signifikant. Nach 5 Tagen waren *Bag-1* *+/+* Neurale Stammzellen zu (40,6±11,7)% Nestin-, zu (45,5±0,8) % dbc- und zu (38,6±3,8) % Map2-positiv (Abb. 20 g, h, j, 21). *Bag-1* *-/-* Neurale Stammzellen waren zu (25,4±4,7) % Nestin-, zu (16,9±3,2) % dbc- und zu (29,8±4,7) % Map2-positiv (Abb. 20 k, l, n, 21). Dabei war der Unterschied der dbc-positiven Zellen in den *Bag-1* *-/-* Neuralen Stammzellen signifikant erniedrigt ( $P < 0,05$ ) (Abb. 21 b). Die Analyse der glialen Marker GFAP und O4 erfolgte nach 5 Tagen. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Genotypen: *Bag-1* *+/+* Neurale Stammzellen waren zu (6,9±1,7) % GFAP-, zu (3,7±0,9) % O4-positiv (Abb. 20 i, j, 21 d). *Bag-1* *-/-* Neurale Stammzellen differenzierten sich jedoch nur zu (1,5±0,2) % in GFAP- und zu (0,2±0,1) % in O4-positive Zellen ( $P < 0,05$ ) (Abb. 20 m, n, 21 d).

Die Gabe von Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) fördert die Differenzierung Neuraler Stammzellen vermehrt in Oligodendrocyten und die Gabe von Leukemia Inhibitory Factor (LIF) in Astrocyten (Barres et al., 1993; Mayer et al., 1994; Lachyankar et al., 1997). *Bag-1* *-/-* Neurale Stammzellen waren durch diese Faktoren in der Lage, sich in Astrocyten und Oligodendrocyten zu differenzieren (Abb. 22). Mit CNTF differenzierten sich *Bag-1* *+/+* Neurale Stammzellen zu (20,3±1,8) % in O4-positive Zellen, *Bag-1* *-/-* Neurale Stammzellen zu (3,6±0,5) % ( $P < 0,001$ ) (Abb. 22 A, C). Die Gabe von LIF differenzierte *Bag-1* *+/+* Neurale Stammzellen zu (70,4±4,1) % GFAP-positiver Zellen, *Bag-1* *-/-* Neurale Stammzellen zu (45,7±3,4) % ( $P < 0,05$ ) (Abb. 22 A, B). Somit kann ausgeschlossen werden, dass ein Fehlen von *Bag-1* die Signalwege, die die gliale Differenzierung der Neuralen Stammzellen aktivieren, stört. Vermutlich sind diese Defekte auf das vermehrte Absterben der *Bag-1* *-/-* Neuralen Stammzellen zurückzuführen.



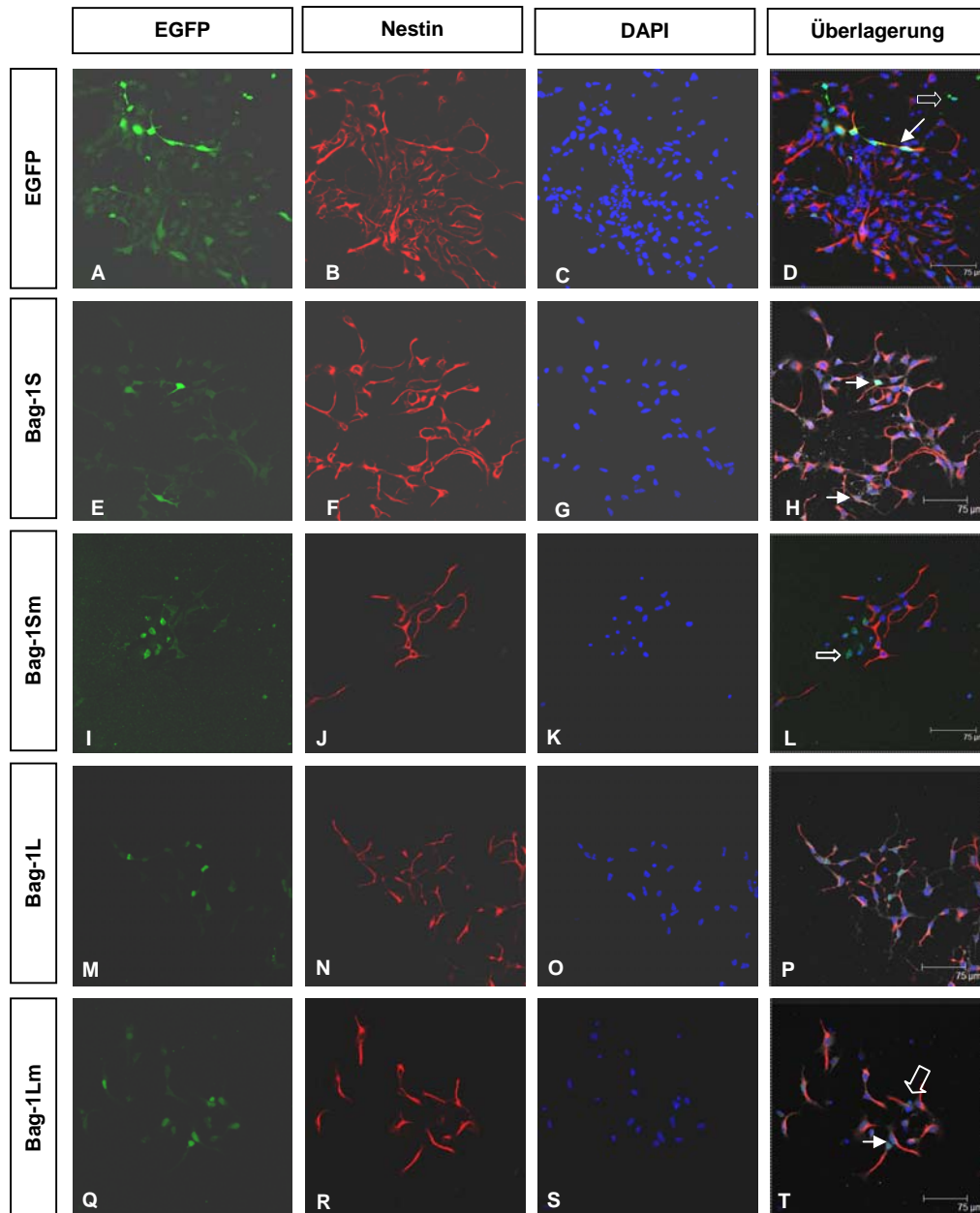
**Abb. 22: *Bag-1* *-/-* Neurale Stammzellen können sich in Astrocyten und Oligodendrocyten differenzieren durch Gabe von CNTF bzw. LIF.** Neurale Stammzellen wurden E11.5 präpariert und für 2–3 Tage mit den Wachstumsfaktoren mEGF und bFGF in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen ausgesät ohne die Faktoren mEGF und bFGF und für 5 Tage in Anwesenheit der Faktoren CNTF oder LIF differenziert. A: Immunfluoreszenzfärbungen von *Bag-1* *-/-* und *Bag-1* *+/+* Neuralen Stammzellen zeigen nach 5 Tagen unter Einfluss von CNTF O4-positive Zellen (↑), unter Einfluss von LIF GFAP-positive (↑). B, C: Quantifizierung von GFAP- und O4 positiven *Bag-1* *-/-* und *Bag-1* *+/+* Neuralen Stammzellen nach 5 Tagen ohne Faktoren, mit CNTF und mit LIF. Es wurden 3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Gliary Fibrillaric Acid Protein (GFAP): Astrocyten Marker; O4: Oligodendrocyten Marker; DAPI: nukleärer Marker. Maßstab 75 µm.

### 3.2.3 Funktionelle Analyse der Maus *Bag-1* Isoformen im Überleben und in der Differenzierung von Neuralen Stammzellen

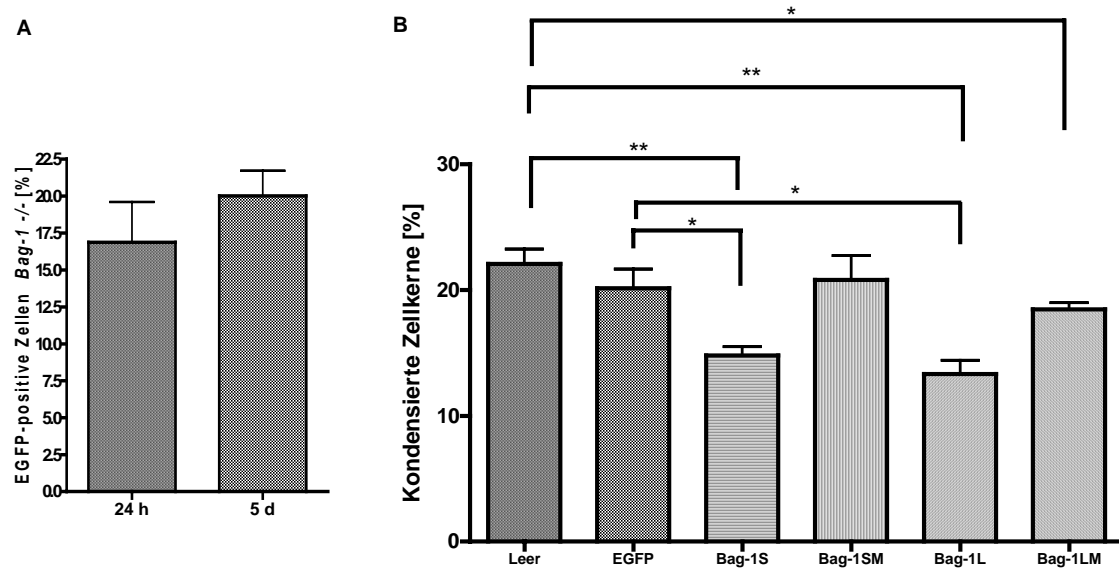
Um zu analysieren, ob die *Bag-1S* oder die *Bag-1L* Isoform sowie die Interaktion von *Bag-1* mit *Hsp70* wichtig für das Überleben und die Differenzierung von Neuralen

Stammzellen ist, wurden *Bag-1*  $-/-$  Neurale Stammzellen mittels Viren mit den Isoformen infiziert. Die Vorteile von Viren-Infektionen sind neben einer stabilen und schonenden Integration der zu analysierenden DNA ins Genom der Zielzelle auch die geringe Menge an Zielzellen, die lediglich notwendig ist (Bender et al., 2006). Bisher war es nur möglich Neurale Stammzellen mittels Elektroporation transient zu transfizieren mit einer hohen Anzahl an Zellen. Dies war für die Primärkulturen, die in dieser Arbeit analysiert werden sollten, nicht zu gewährleisten. Ein weiterer Nachteil der Elektroporation sind hohe Apoptoseraten. Für die Viren-Infektion wurden die EGFP-*Bag-1S*, *-L*, *Sm* und *Lm* Sequenzen der unter 3.1 beschriebenen Plasmide isoliert und in den pGJ3-Vektor kloniert. Nach erfolgreicher Viren-Produktion wurden *Bag-1*  $-/-$  Neurale Stammzellen mit den verschiedenen Viren infiziert und differenziert. Infizierte Zellen konnten anhand der EGFP-Fluoreszenz identifiziert werden. Die Infektionsrate von EGFP lag 24 Stunden nach Viren-Infektion bei  $(16,9 \pm 2,7)$  %, nach 5 Tagen bei  $(20,0 \pm 1,7)$  % (Abb. 24 A). Somit war gewährleistet, dass für die Differenzierungsanalyse nach 5 Tagen noch eine ausreichende Menge infizierter Zellen vorhanden war.

*Bag-1S* und *Bag-1Sm* waren im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert, *Bag-1L* und ihre Mutante nur im Zellkern (Abb. 23 E, I, M, Q). Für die Bestimmung der Apoptose wurden kondensierte Zellkerne ausgezählt. Da kondensierte Zellkerne oftmals kein Zytoplasma mehr aufweisen, wurde nicht berücksichtigt, ob es sich um infizierte Zellen handelte. Es wurden mindestens 500 Zellen ausgewertet. Die Anzahl kondensierter Zellkerne von EGFP-*Bag-1S* infizierten *Bag-1*  $-/-$  Neuralem Stammzellen war bereits nach 24 Stunden auf  $(14,8 \pm 0,7)$  % gesunken im Vergleich zu *Bag-1*  $-/-$   $(22,1 \pm 1,2)$  % und EGFP-infizierten Zellen  $(20,1 \pm 1,5)$  %. Dieser Unterschied war signifikant ( $P < 0,05$ ) (Abb. 23, 24 B). Die mit der *Bag-1Sm*-Isoform infizierten *Bag-1*  $-/-$  Neuralem Stammzellen zeigten diesen Effekt jedoch nicht. Die Anzahl kondensierter Zellkerne veränderte sich im Vergleich zur Kontrolle kaum  $(20,8 \pm 1,9)$  % (Abb. 24 B). Ebenso haben *Bag-1L* infizierte *Bag-1*  $-/-$  Neurale Stammzellen eine verringerte Anzahl kondensierter Zellkerne  $(13,3 \pm 1,1)$  %, der ebenfalls signifikant war ( $P < 0,05$ ), jedoch nicht *Bag-1Lm* infizierte Zellen  $(18,5 \pm 0,5)$  % (Abb. 23, 24 B). Demnach sind sowohl die *Bag-1S*- als auch die *Bag-1L*-Isoform wichtig für das Überleben Neuralem Stammzellen, sowie die Interaktion von *Bag-1* mit Hsp70.

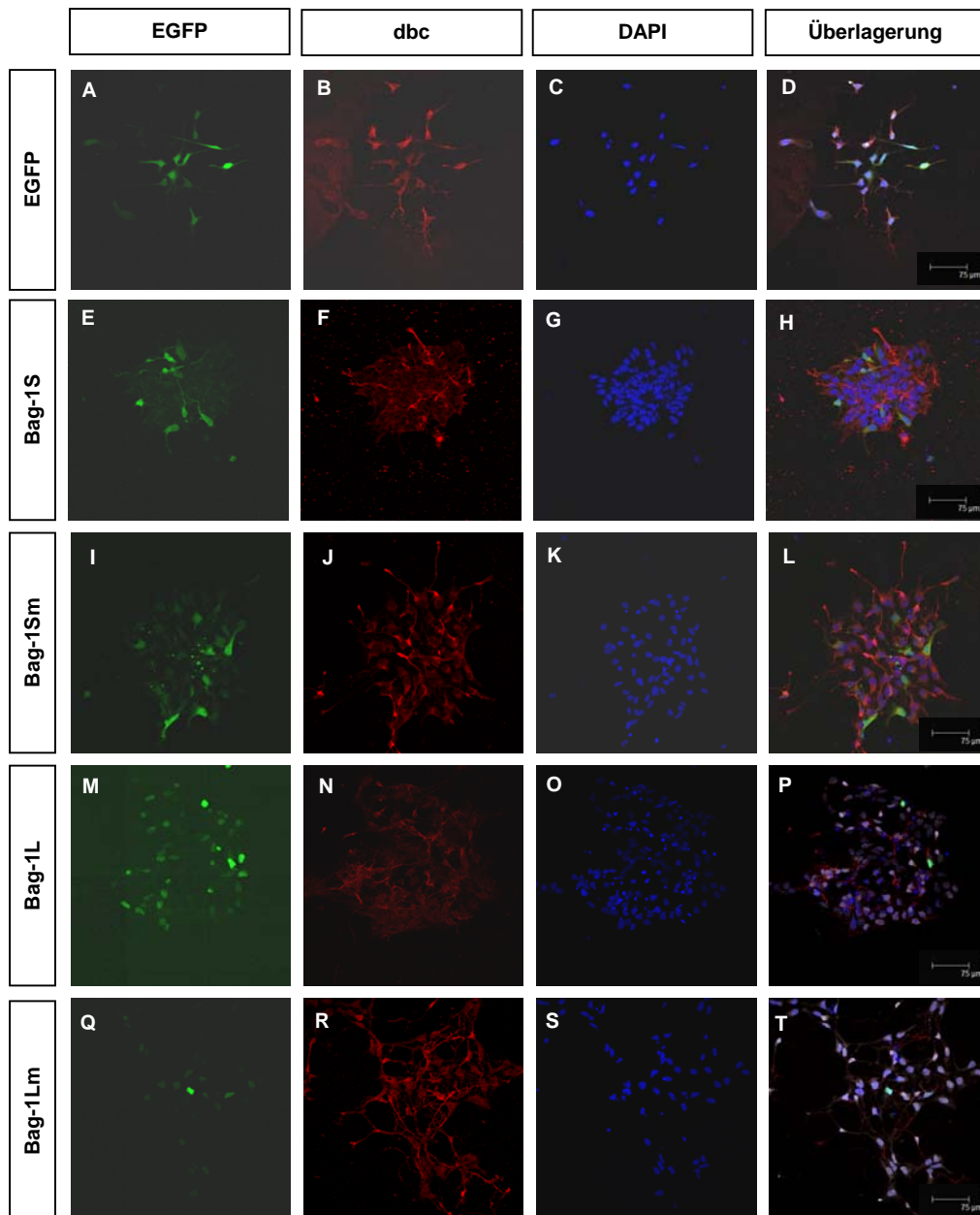


**Abb. 23: Die Bag-1 Isoformen sind wichtig für das Überleben von Neuralen Stammzellen.** Neuronale Stammzellen wurden E11.5 präpariert und für 2-3 Tage mit den Wachstumsfaktoren mEGF und bFGF in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen ausgesät mit Faktoren. Nach Attachierung der Zellen, wurde das Medium durch Virus-Überstand inklusive mEGF und bFGF, ausgewechselt. Nach 24 Stunden wurde der Virus-Überstand abgesaugt und die Differenzierung durch Medium ohne Faktoren eingeleitet. Die Zellen wurden nach 24 Stunden fixiert und analysiert. Infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuronale Stammzellen mit den Bag-1 Isoformen und ihrer Mutanten konnten anhand des EGFP-Signals identifiziert werden. Als Kontrolle dienten EGFP-infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuronale Stammzellen. Als Neuronaler Stammzell- und zytoplasmatischer Marker wurde Nestin, als nukleärer Marker wurde DAPI verwendet. ↑ Intakter Zellkern, ↑ kondensierter Zellkern. Maßstab 75 µm.

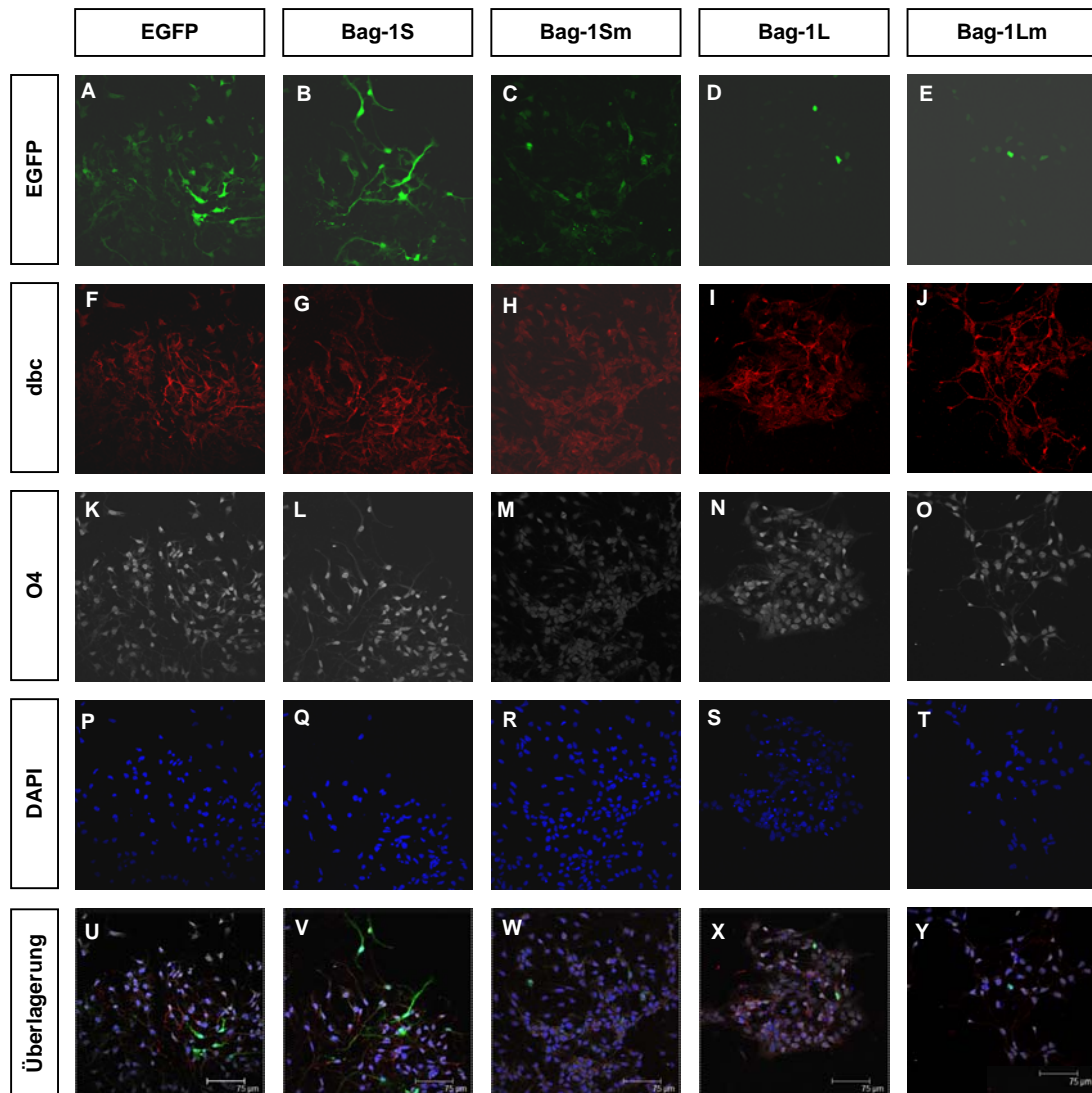


**Abb. 24: Die Bag-1 Isoformen sind wichtig für das Überleben von Neuralen Stammzellen.** Neurale Stammzellen wurden E11.5 präpariert und für 2-3 Tage mit den Wachstumsfaktoren mEGF und bFGF in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen mit Faktoren ausgesät. Nach Attachierung der Zellen, wurde das Medium durch Virus-Überstand inklusive mEGF und bFGF ausgewechselt. Nach 24 Stunden wurde der Virus-Überstand abgesaugt und die Differenzierung durch Medium ohne Faktoren eingeleitet. Die Zellen wurden nach 24 Stunden fixiert und analysiert. A: Quantifizierung EGFP-positiver Zellen 24 Stunden und 5 Tage nach Infektion. B: Quantifizierung kondensierter Zellkerne 24 Stunden nach Infektion mit EGFP-, EGFP-Bag-1S, -Sm, -L und -LM. Es wurden 3 voneinander unabhängige Infektionen ausgewertet ( $P < 0,05$ ).

Die Differenzierungsanalyse erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz mittels spezifischer Antikörper gegen die Marker-Proteine Nestin (Neuraler Stammzellen Marker), Map2 (neuronaler Marker), doublecortin (frühe postmitotische Neurone), O4 (frühe Oligodendrocyten) und GFAP (Astrocyten). Wie in Abb. 23 zu sehen, waren mit den Bag-1 Isoformen infizierte Zellen durchaus Nestin-positiv. Die Analyse weiterer Marker ergab jedoch, dass infizierte Zellen nicht dbc-, O4-, Map2- oder GFAP-positiv waren (Abb. 25-26). Die Bag-1 Isoformen sind daher vermutlich primär für das Überleben Neuraler Stammzellen wichtig, aber nicht für deren Differenzierung.

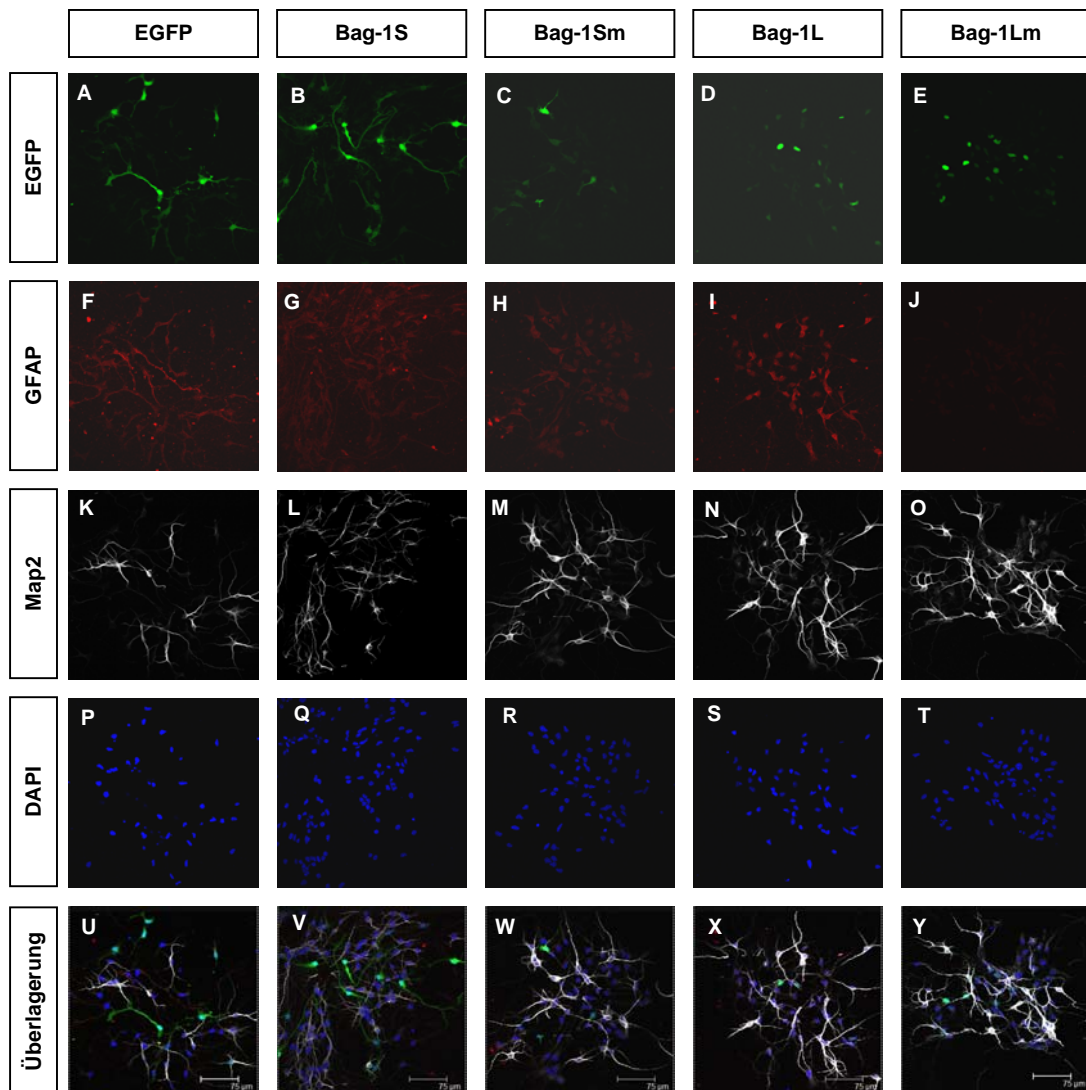


**Abb. 25: Die Bag-1 Isoformen können die Differenzierung von *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen in dbc-positive Neurale Stammzellen nicht beeinflussen.** Neurale Stammzellen wurden E11.5 präpariert und für 2-3 Tage mit den Wachstumsfaktoren mEGF und bFGF in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen ausgesät mit Faktoren. Nach Attachierung der Zellen, wurde das Medium durch Virus-Überstand inklusive mEGF und bFGF, ausgewechselt. Nach 24 Stunden wurde der Virus-Überstand abgesaugt und die Differenzierung durch Medium ohne Faktoren eingeleitet. Die Zellen wurden nach 2 Tage fixiert und analysiert. Mit den Bag-1 Isoformen infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen konnten anhand des EGFP-Signals identifiziert werden. Als Kontrolle dienten EGFP-infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen. Infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen doublecortin (dbc) für frühe postmitotische Neurone analysiert. DAPI: nukleärer Marker. Maßstab 75 µm.



**Abb. 26: Die Bag-1 Isoformen können nicht die Differenzierung von *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuralen Stammzellen in dbc- und O4-positive Neurale Stammzellen beeinflussen.** Neurale Stammzellen wurden E11.5 präpariert und für 2-3 Tage mit den Wachstumsfaktoren mEGF und bFGF in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläsern ausgesät mit Faktoren. Nach Attachierung der Zellen, wurde das Medium durch Virus-Überstand inklusive mEGF und bFGF, ausgewechselt. Nach 24 Stunden wurde der Virus-Überstand abgesaugt und die Differenzierung durch Medium ohne Faktoren eingeleitet. Die Zellen wurden nach 5 Tagen fixiert und analysiert. Mit den Bag-1 Isoformen infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen konnten anhand des EGFP-Signals identifiziert werden. Als Kontrolle dienten EGFP-infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen. Infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen doublecortin (dbc) für frühe postmitotische Neurone und O4 für frühe Oligodendrocyten analysiert. DAPI: nukleärer Marker. Maßstab 75 µm.





**Abb. 27: Die Bag-1 Isoformen können nicht die Differenzierung von *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuralen Stammzellen in Map2- und GFAP-positive Neurale Stammzellen beeinflussen.** Neurale Stammzellen wurden E11.5 präpariert und für 2–3 Tage mit den Wachstumsfaktoren mEGF und bFGF in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen ausgesät mit Faktoren. Nach Attachierung der Zellen, wurde das Medium durch Virus-Überstand inklusive mEGF und bFGF, ausgewechselt. Nach 24 Stunden wurde der Virus-Überstand abgesaugt und die Differenzierung durch Medium ohne Faktoren eingeleitet. Die Zellen wurden nach 5 Tagen fixiert und analysiert. Infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> mit den Bag-1 Isoformen und ihrer Mutanten konnte anhand des EGFP-Signals identifiziert werden. Als Kontrolle dienten EGFP-infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen. Mit Bag-1 Isoformen infizierte *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen Map2 für Neurone und GFAP für Astrocyten analysiert. DAPI: nukleärer Marker. Maßstab 75  $\mu\text{m}$ .

### **3.3 Funktionelle Analyse von Bag-1 in der Modulation des Glucocorticoid-Rezeptors in Neuralen Stammzellen**

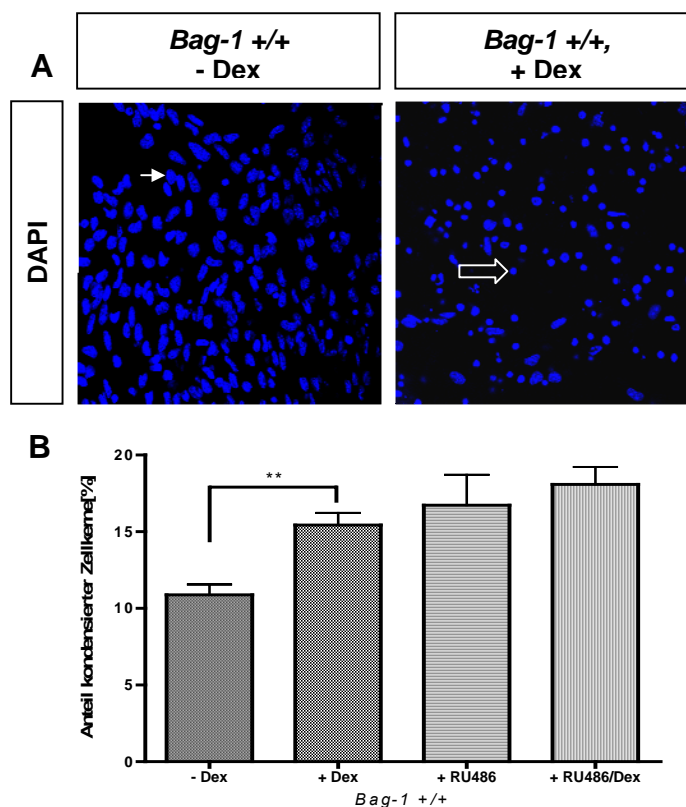
Hohe Dosen von Glucocorticoiden können zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Überleben beeinflussen. U. a. wird die Neuroneogenese im Hippocampus durch Glucocorticoide beeinflusst (Cameron und Gould, 1994; Hassan et al., 1996; Gould et al., 1997; Rodriguez et al., 1998; Tanapat et al. 1999; Coe et al., 2003; Haynes et al., 2001; Montaron et al., 2006). Die molekularen Mechanismen dieser Effekte sind jedoch noch unbekannt. Bag-1 ist ein Schlüssel-Molekül in diesen Prozessen, da es an der Faltung und der Aktivität des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) beteiligt ist (Hohfeld und Jentsch, 1997; Takayama et al., 1997; Zeiner et al., 1997; Bimston et al., 1998; Gebauer et al., 1998; Kullmann et al., 1998; Nollen et al., 2000; Kanelakis et al., 2000; Cato und Mink, 2001).

Daher sollte anhand des *in vitro* Modells der Neuralen Stammzellen das Überleben unter dem Einfluss von Glucocorticoiden analysiert werden und welche Rolle die Maus Bag-1 Isoformen in diesen Prozessen spielen. Außerdem sollte für spätere *in vivo* Analysen zum Einfluss von Glucocorticoiden auf die Neuroneogenese im Hippocampus adulter Mäuse eine geeignete Methode etabliert werden.

#### **3.3.1 Analyse des Überlebens von Bag-1 +/+ Neuralen Stammzellen unter dem Einfluss von Dexamethason**

Da verschiedene Studien gezeigt haben, dass Glucocorticoide in vielen Zellarten auch Apoptose auslösen können (Thompson, 1999; McEwen, 2000; Haynes et al., 2001), wurden *Bag-1* +/+ Neurale Stammzellen mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason (Dex) behandelt. Dex wurde in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt, die sich an vorherigen Veröffentlichungen orientierte (Morishima et al., 2000). Die Stammzellen wurden 24 Stunden nach Zugabe von Dex analysiert, da Apoptose ein in der Regel schneller Prozess ist und apoptotische Zellen während längerer Inkubationen wegdiffundieren und so nicht mehr quantifiziert werden können. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden mindestens 300 Zellkerne ausgezählt und zwischen kondensierten und intakten Zellkernen unterschieden. Es ergab sich, dass *Bag-1* +/+ Neurale Stammzellen auf Dex mit erhöhter Apoptose reagieren. Es wurden  $(10,9 \pm 0,7)$  % kondensierte Zellkerne in unbehandelten *Bag-1* +/+ Neurale Stammzellen ermittelt, mit Dex stieg dieser Wert signifikant auf

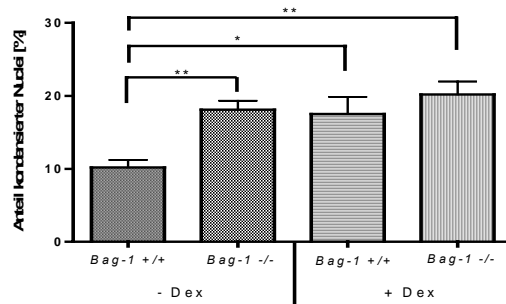
(15,4±0,8) % an. Dex, als Agonist des GR, bindet an diesen und aktiviert ihn: der Rezeptor und sein Agonist wandern in den Zellkern, der Rezeptor bindet an die DNA und startet die Transkription (Cato und Mink, 2001). Antagonisten, wie z. B. RU486, binden zwar an den Rezeptor, dieser wird jedoch nicht aktiviert (Beck et al., 1993). Somit könnte RU486 als Negativkontrolle geeignet sein. *Bag-1* *+/+* Neurale Stammzellen, die mit RU486 behandelt wurden, zeigten jedoch einen signifikanten Anstieg an kondensierten Zellkerne (16,7±2,0) %. Eine Vorbehandlung mit RU486, um alle Andockstellen für Dex zu besetzen, und die anschließende Zugabe von Dex zu *Bag-1* *+/+* Neuralen Stammzellen, führte ebenso zu einem signifikanten Anstieg an kondensierten Zellkernen (18,1±1,1) %. Da RU486 in Ethanol gelöst werden musste, scheint bereits dieses bei Neurale Stammzellen einen signifikanten Anstieg von kondensierten Zellkernen auszulösen. RU486 gelöst in Ethanol ist demnach keine geeignete Negativkontrolle.



**Abb. 28: Dex beeinflusst das Überleben von *Bag-1* *+/+* Neuralen Stammzellen.** *Bag-1* *+/+* Neurale Stammzellen wurden E11.5 präpariert und für mehrere Tage mit den Wachstumsfaktoren mEGF und bFGF in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie ohne Faktoren auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen ausgesät und entweder mit Dex (EK 1  $\mu$ M), mit RU486 (EK 23  $\mu$ M) oder mit RU486 (EK 23  $\mu$ M) für 2 Stunden und anschließend Dex (EK 1  $\mu$ M) behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte *Bag-1* *+/+* Neuraler Stammzellen verwendet. Nach 24 Stunden Differenzierung wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI markiert. A: Markierte Zellkerne in *Bag-1* *+/+* Neuraler Stammzellen.  $\uparrow$  Intakter Zellkern,  $\hat{\uparrow}$  kondensierter Zellkern. B: Quantifizierung der kondensierten Zellkerne. Es wurden 3 voneinander unabhängige Experimente ausgewertet (P < 0,05).

### 3.3.2 Analyse des Überlebens von *Bag-1* <sup>-/-</sup> Neuralen Stammzellen unter dem Einfluss von Dexamethason

*Bag-1* ist laut Literatur als ein Inhibitor für die GR-Aktivierung bekannt (Cato und Mink, 2000). Diese inhibierende Wirkung wird den humanen *Bag-1* Isoformen *Bag-1M* und *Bag-1L* zugesprochen (Cato und Mink, 2000). Fehlten diese Isoformen in Zelllinien, führte die Gabe von Dex zu einer erhöhten Rezeptor-Aktivität. In dem Organismus Maus fehlt das Äquivalent der humanen *Bag-1M* Isoform, es werden lediglich die *Bag-1S* und die *Bag-1L* Isoform exprimiert. In Neuralen Stammzellen der Maus wird vorwiegend *Bag-1S* exprimiert, *Bag-1L* nur sehr schwach (s. Abb. 18). Bei einer Behandlung von *Bag-1* <sup>-/-</sup> Neuralen Stammzellen mit Dex würde man demnach eine gesteigerte Rezeptor-Aktivität erwarten, die eine im Vergleich zu *Bag-1* <sup>+/+</sup> Neuralen Stammzellen eine erhöhte Apoptose nach sich zieht, da der inhibierende Einfluss von *Bag-1M* oder *-L* fehlt. Daher wurden *Bag-1* <sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen mit Dex (EK 1  $\mu$ M) behandelt und mit dem nukleären Marker DAPI die kondensierten Zellkerne nach 24 Stunden Differenzierung analysiert. Dabei wurden mindestens 500 Zellkerne gezählt. Im Gegensatz zu *Bag-1* <sup>+/+</sup> Neuralen Stammzellen, die mit Dex behandelt wurden, zeigten mit Dex behandelte *Bag-1* <sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl kondensierter Zellkerne (Abb. 29). Der Anteil kondensierter Zellkerne von Dex behandelten *Bag-1* <sup>+/+</sup> Neuralen Stammzellen lag bei (17,5 $\pm$ 2,4) %, von *Bag-1* <sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen bei (18,1 $\pm$ 1,2) %, nach Behandlung mit Dex bei (20,2 $\pm$ 1,8) %.

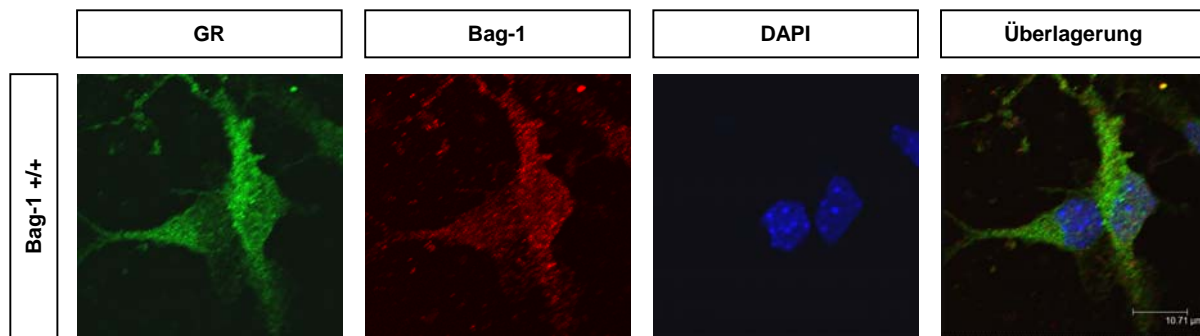


**Abb. 29: Dex hat keinen Einfluss auf das Überleben von *Bag-1* <sup>-/-</sup> Neuralen Stammzellen.** Neurale Stammzellen wurden E11.5 präpariert und für mehrere Tage mit den Wachstumsfaktoren mEGF und bFGF in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie ohne Faktoren auf Poly-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen ausgesät und mit Dex (EK 1  $\mu$ M) behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte *Bag-1* <sup>+/+</sup> Neurale Stammzellen und *Bag-1* <sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen verwendet. Nach 24 Stunden Differenzierung wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne mit DAPI markiert und die kondensierten Zellkerne quantifiziert. Es wurden 3 voneinander unabhängige Experimente ausgewertet ( $P < 0,05$ ).

Da *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen nicht auf Dex in der eingesetzten Konzentration reagieren, besteht die Möglichkeit, dass es durch das Fehlen von Bag-1 zu Problemen in der Signalkette kommt.

### 3.3.3 Die funktionelle Analyse der Maus Bag-1 Isoformen in der Modulation des GR

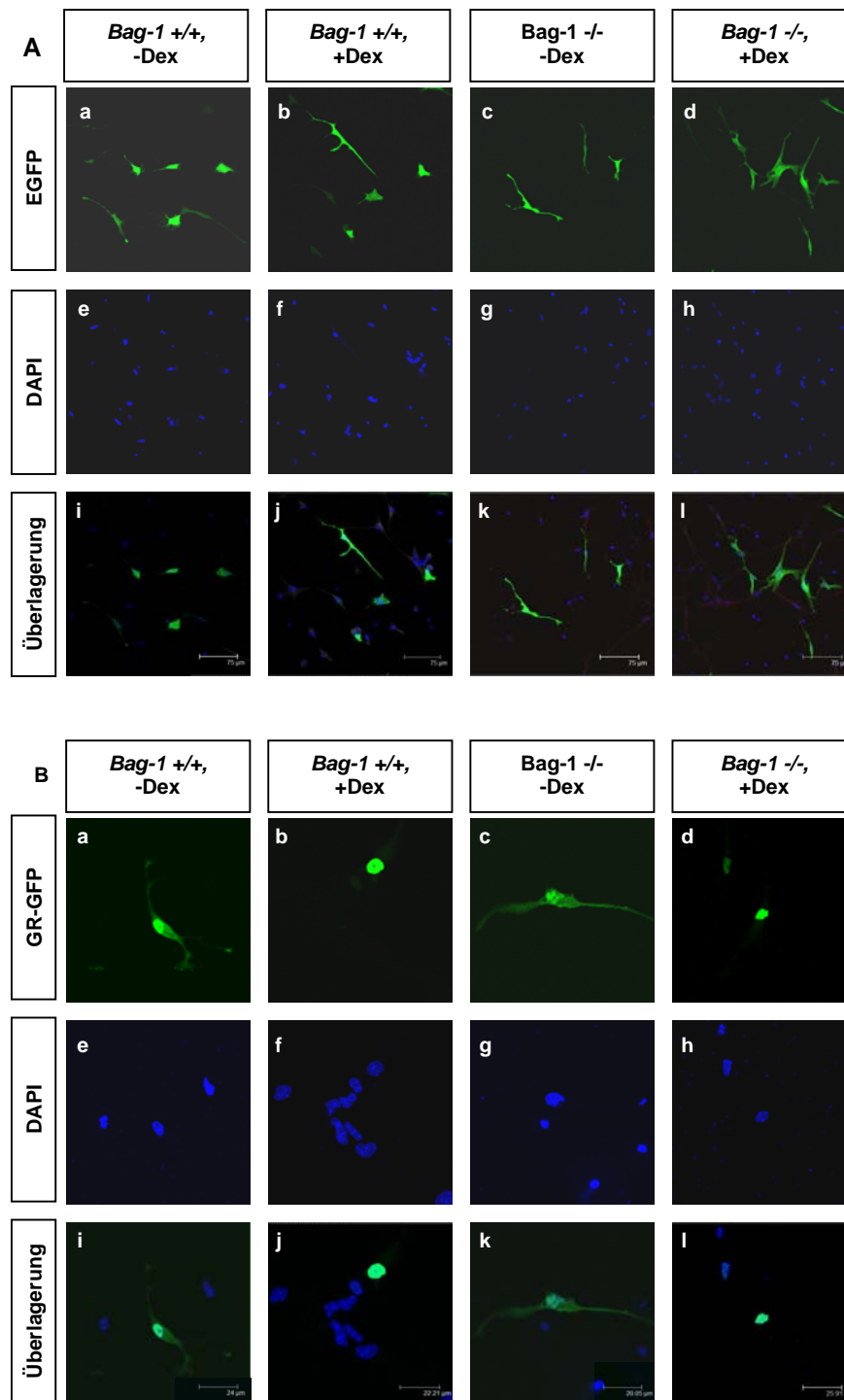
Da Bag-1 nicht nur die Aktivität des GR direkt beeinflussen kann, sondern auch bei der Faltung des Rezeptors und der Translokation in den Zellkern eine wichtige Rolle spielt, galt es zu untersuchen, ob das Fehlen von Bag-1S und Bag-1L in *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuralen Stammzellen einen Einfluss auf die Translokationsfähigkeit des Rezeptors hat. Die endogene Expression des GR in *Bag-1*<sup>+/+</sup> Neuralen Stammzellen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Immunfluoreszenzanalyse zeigt, dass der GR in Neuralen Stammzellen teilweise im Zellkern und Zytoplasma exprimiert wird. Im Zellkern sind einzelne Anhäufungen zu erkennen, im Zytoplasma ist die Expression diffus, konzentrierte sich aber in einigen perinukleären Anhäufungen.



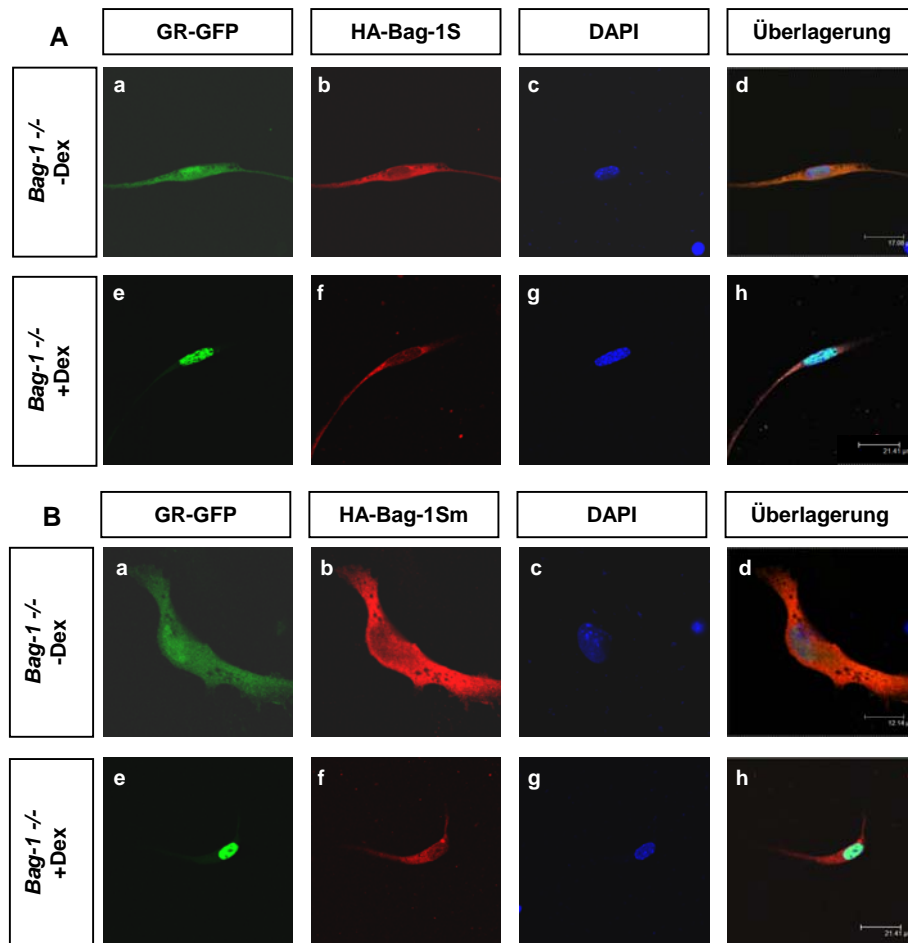
**Abb. 30: Der endogene GR ist in Neuralen Stammzellen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert.** Bag-1<sup>+/+</sup> Neurale Stammzellen wurden E11.5 präpariert und für mehrere Tage mit den Wachstumsfaktoren mEGF und bFGF in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie ohne Faktoren auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen differenziert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Es wurden mindestens 3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. GR: Glucocorticoid-Rezeptor, DAPI: nukleärer Marker. Maßstab 10,71 µm.

Um die Translokation des GR in *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen besser verfolgen und den Einfluss der beiden Bag-1 Isoformen analysieren zu können, wurden *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen mit dem Expressionsplasmid GR-GFP (Gabe von Cato, A.) transient transfiziert, sowie in Kombination mit den Expressionsplasmiden Ha-Bag-1S, -Sm, -L und -Lm. Die Expression dieser Konstrukte ist anderweitig geprüft

worden (Zisimopoulos, W.; unpubliziert). EGFP diene als Kontrolle. Diese Expressionskonstrukte konnten nur mittels Elektroporation transient transfiziert werden. Weil für diese Transfektionsmethode eine große Anzahl an Zellen erforderlich ist, wurden Neuronale Stammzellen bis zu 2 Wochen mit Wachstumsfaktoren in Kultur gehalten. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 1 Stunde mit Dex ohne Wachstumsfaktoren behandelt, fixiert und die Expression und Translokation des GR anhand der GFP-Fluoreszenz und die Expression der Ha-Plasmide mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Das GFP-Signal des GR zeigt sowohl in *Bag-1* *+/+* als auch *Bag-1* *-/-* Neuronale Stammzellen eine starke nukleäre und eine wesentlich schwächere zytoplasmatische Expression. Einige Zellen weisen nur ein nukleäres Signal auf (Abb. 31). Diese subzelluläre Lokalisation von GR-GFP ähnelt der des endogenen GR. Da die Transfektionsrate des GR-GFP-Plasmids jedoch sehr niedrig war, ( $6,1 \pm 1,8$ ) %, waren Quantifizierungen nicht möglich. Die Koexpression von GR-GFP und Ha-Bag-1S zeigt keine Änderungen in der subzellulären Lokalisation des GR und Bag-1S, Bag-1S ist hauptsächlich im Zytoplasma verteilt (Abb. 32 A). Dasselbe Expressionsmuster zeigt Ha-Bag-1Sm (Abb. 32 B). Wird jedoch Ha-Bag-1L und GR-GFP koexprimiert, zeigt Bag-1L starke lokale Anhäufungen im Zellkern und Kolo-kalisierung mit GR-GFP, nach Gabe von Dex verschwinden diese Anhäufungen von Bag-1L in einigen Zellen, in anderen verändert sich nichts (Abb. 33 A). Die Koexpression von GR-GFP und Ha-Bag-1Lm führt nicht zu Anhäufungen, Bag-1Lm ist diffus im Zellkern verteilt, auch nach Gabe von Dex (Abb. 33 B). Demnach scheint die Bag-1L-Isoform der Maus, ebenso wie das humane Bag-1L einen Einfluss auf den GR zu nehmen. Ein Einfluss von Bag-1S konnte nicht beobachtet werden. Da jedoch aufgrund der geringen Transfektionsrate keine Quantifizierungen möglich waren und auch nicht geklärt ist, warum der GR in Neuronale Stammzellen auch ohne Gabe von Dex im Zellkern lokalisiert ist, müssen neue Wege und eventuell andere *in vitro* Modelle zur weiteren Analyse des Einflusses von Glucocorticoiden auf die neuronale Differenzierung gefunden werden.

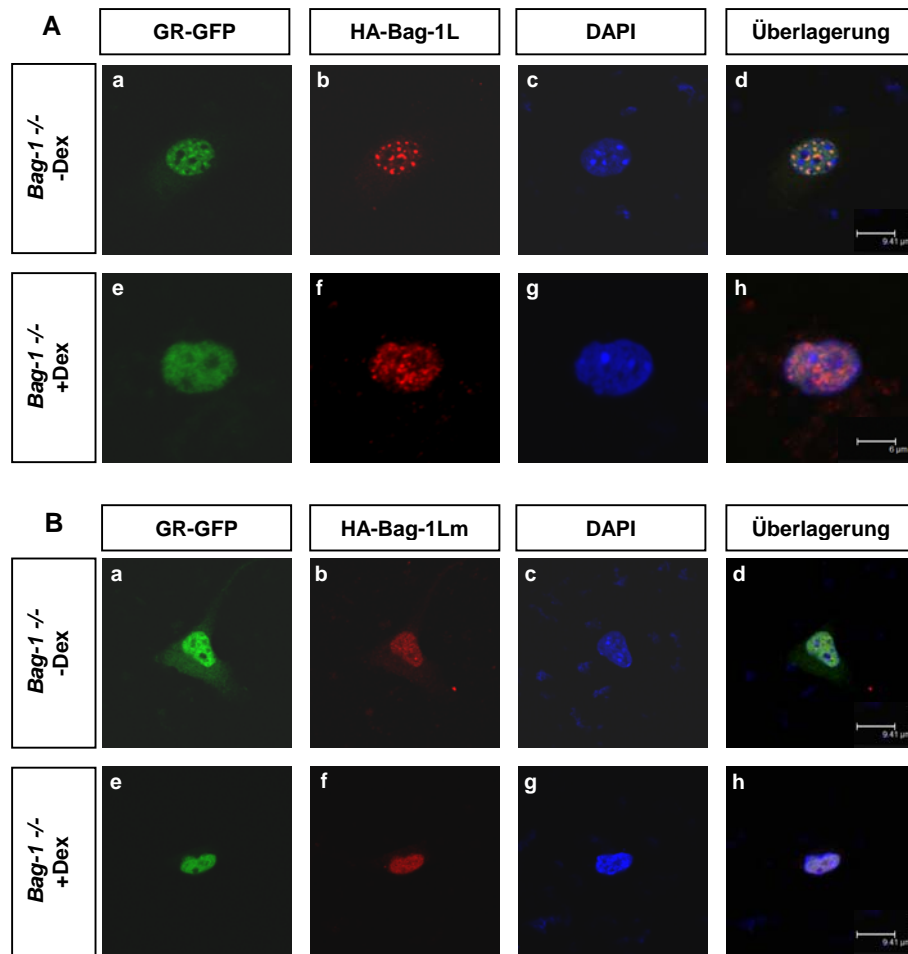


**Abb. 31: Der GR wird vorwiegend im Zellkern überexprimiert.** Neuronale Stammzellen wurden nach der Präparation mit den Faktoren mEGF und bFGF für bis zu 2 Wochen in Kultur gehalten. Nach Elektroporation mit den Plasmiden EGFP (A) und GR-GFP (B) wurden die Zellen auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen mit mEGF und bFGF für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach Entzug der Faktoren wurden die Zellen 1 Stunde unter Gabe von Dex (EK 1 µM) differenziert. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Gabe von Dex. Nach Fixierung der Zellen erfolgte die weitere Analyse anhand der GFP-Fluoreszenz. Maßstab: A 75 µm; B (a, e, i) 24 µm; (b, f, j) 22,21 µm; (c, g, k) 20,05 µm; (d, h, l) 25,91 µm. GR: Glucocorticoid-Rezeptor, DAPI: nukleärer Marker.



**Abb. 32: HA-Bag-1S hat keinen Einfluss auf das GR-GFP Signal.** Neuronale Stammzellen wurden nach der Präparation mit den Faktoren mEGF und bFGF für bis zu 2 Wochen in Kultur gehalten. Nach Elektroporation mit den Plasmiden GR-GFP mit HA-Bag-1S und -Sm wurden die Zellen auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen mit mEGF und bFGF für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach Entzug der Faktoren wurden die Zellen 1 Stunde unter Gabe von Dex (EK 1  $\mu$ M) differenziert. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Gabe von Dex. Nach Fixierung der Zellen erfolgten die weiteren Analysen mittels indirekter Immunfluoreszenz und durch die GFP-Fluoreszenz. Maßstab: A (a-d) 17,08  $\mu$ m, A (e-h) 21,41  $\mu$ m, B (a-d) 12,14  $\mu$ m, B (e-h) 21,41  $\mu$ m. GR: Glucocorticoid-Rezeptor, DAPI: nukleärer Marker.

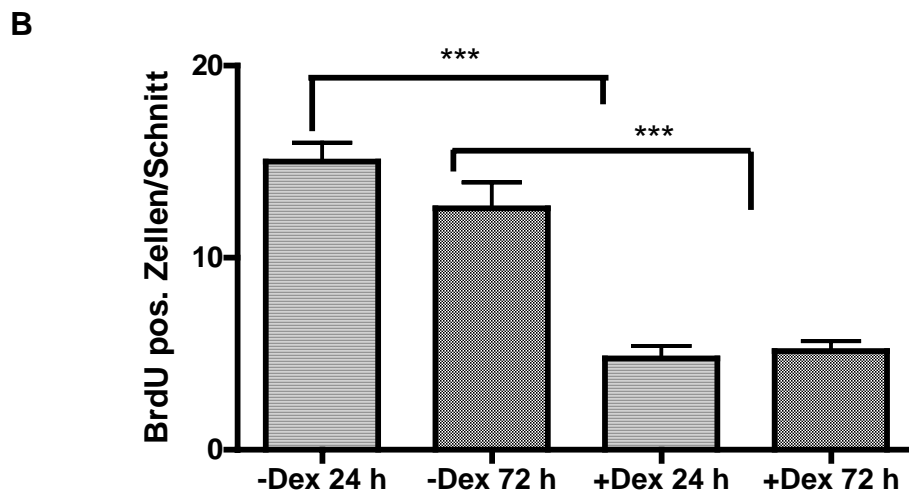
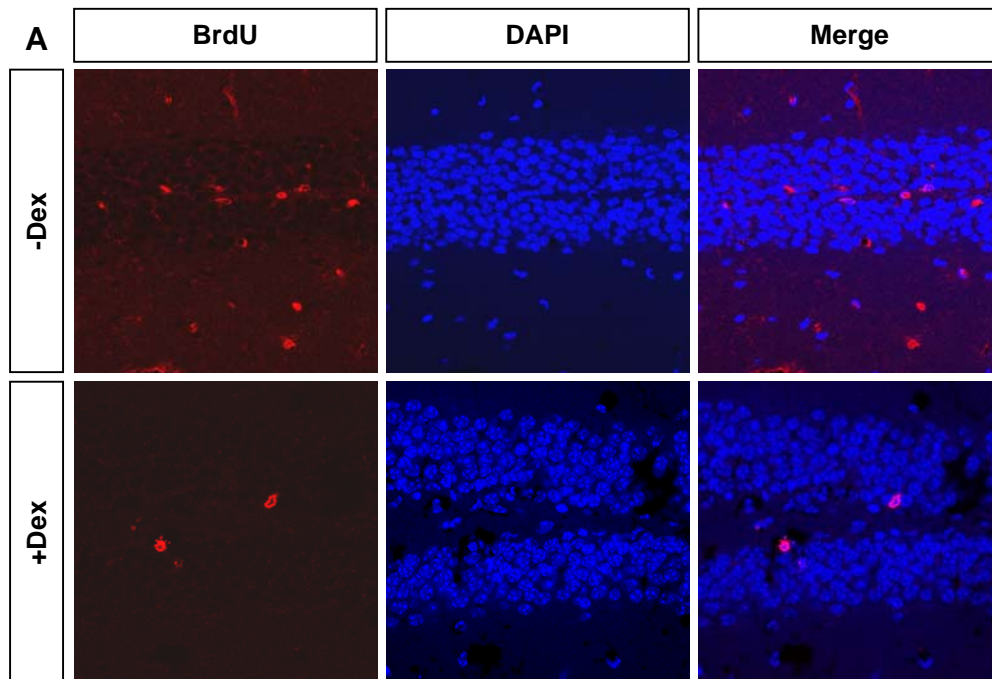




**Abb. 33: GR-GFP und HA-Bag-1L sind kolokalisiert.** Neurale Stammzellen wurden nach der Präparation mit den Faktoren mEGF und bFGF für bis zu 2 Wochen in Kultur gehalten. Nach Elektroporation mit den Plasmiden GR-GFP mit HA-Bag-1L und -Lm wurden die Zellen auf Poly-DL-Ornithin/Lam-1 beschichtete Deckgläschen mit mEGF und bFGF für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach Entzug der Faktoren wurden die Zellen 1 Stunde unter Gabe von Dex (EK 1  $\mu$ M) differenziert. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Gabe von Dex. Nach Fixierung der Zellen erfolgten die weiteren Analysen mittels indirekter Immunfluoreszenz und durch die GFP-Fluoreszenz. Maßstab: A (a-d) 9,41  $\mu$ m und (e-h) 6  $\mu$ m, B (a-d) 9,41  $\mu$ m und (e-h) 9,41  $\mu$ m. GR: Glucocorticoid-Rezeptor, DAPI: nukleärer Marker.

### 3.3.4 Etablierung einer *in vivo* Methode zur Analyse des Einfluss von Glucocorticoiden auf die Neuroneogenese in adulten Mäusen

Da das Modell der primären embryonalen Neuralen Stammzellen nicht geeignet ist, um den Einfluss von Glucocorticoiden auf die Neuroneogenese in adulten Tieren zu analysieren, sollte in dieser Arbeit erste Ansätze einer Methode im Labor entwickelt werden, die es ermöglicht den Einfluss von Glucocorticoiden *in vivo* im adulten Tier zu analysieren. Es gibt bereits *in vivo* Studien zu diesem Thema, die eine Orientierung für die Durchführung geben konnten (Kim et al., 2004). Des Weiteren war bekannt, dass in männlichen Mäusen des Stammes Bl6, die Neuroneogenese am stärksten ist (Schauwecker, 2006). Daher wurden hier für einen ersten Ansatz insgesamt 6 adulte männliche Mäuse des Bl6-Stammes verwendet, die circa 4-6 Wochen alt waren. Um die Neuroneogenese zu verfolgen, wurde BrdU verwendet, ein Marker für mitotische Zellen (Alberts et al., 1994). Die Mäuse erhielten 2 BrdU-Injektionen im Abstand von 6 Stunden intraperitoneal (i. p., 100 µg/g Körpergewicht). 3 Stunden nach der ersten Injektion bekamen 3 Mäuse ein Injektion i. p. mit Dex (Dex-Mäuse, 50 µg/g Körpergewicht), die anderen 3 als Negativ-Kontrolle NaCl (Kontroll-Mäuse, 0,9 % NaCl, 10 µl/g Körpergewicht). 24 Stunden nach der ersten BrdU Injektion wurden 2 Dex-Mäuse und 2 Kontroll-Mäuse perfundiert und der Hippokampus mittels Kryoschnitte analysiert. Die übrigen Mäuse erhielten für 2 weitere Tage je eine BrdU-Injektion und wurden 72 Stunden nach der Dex-Injektion perfundiert und ebenfalls anhand von Kryoschnitten analysiert. Zur Analyse der Neuroneogenese wurde diejenigen Zellen, die BrdU inkorporiert hatten und somit mitotisch waren, mittels eines spezifischen Antikörpers gegen BrdU mit indirekter Immunfluoreszenz markiert. Zur Analyse der Apoptose wurde DAPI als nukleärer Marker verwendet. 24 Stunden nach der Dex-Injektion zeigten die Kontroll-Mäuse  $15 \pm 0,98$  positive BrdU-Zellen pro Sektion, die Dex-Mäuse dagegen wiesen eine signifikante Abnahme auf  $4,75 \pm 0,65$  pro Sektion vor (Abb. 34). Auch nach 72 Stunden zeigten sich signifikante Unterschiede, die Kontroll-Mäuse hatten  $12,57 \pm 1,36$  BrdU-positive Zellen pro Sektion im Vergleich zu den Dex-Mäusen  $5,1 \pm 0,5$  (Abb. 34). Um ein Maß für Apoptose zu bestimmen, wurden die Sektionen nach kondensierten Zellkernen analysiert. Es konnten jedoch in allen Schnitten keine gefunden werden. Demnach zeigt die einmalige Gabe von Dex einen Einfluss auf die Proliferation, jedoch nicht auf die Apoptose.



**Abb. 34: Eine Behandlung mit Dex beeinflusst die Neuroneogenese, aber nicht die Apoptose im Hippokampus.** Männliche Bl6-Mäuse wurden mit BrdU, Dex und/oder NaCl behandelt. 24 bzw. 72 Stunden nach Dex- bzw. NaCl-Injektion wurden die Mäuse perfundiert und der Hippokampus mittels Kryoschnitte analysiert. Zellen, die BrdU inkorporiert hatten, wurden mit einem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht. Um kondensierte Zellkerne kenntlich zu machen, wurde DAPI als nukleärer Marker verwendet. (A) Die Abbildungen zeigen representative Bilder vom Hippokampus der behandelten Mäuse. In den Kontroll-Mäusen weist der Hippokampus in allen Regionen BrdU-positive Zellen auf. Bei den Dex-Mäusen ist diese Zahl signifikant reduziert ( $P < 0.001$ ), sowohl nach 24 Stunden als auch nach 72 Stunden. Kondensierte Zellkerne konnten in keinen der Schnitte gefunden werden. (B) Quantifizierung BrdU positiver Zellen im Hippokampus von Kontroll- und Dex-Mäusen. Es wurden mindestens 7 Sektionen pro Maus ausgewertet.

## 4. Diskussion

Die Prozesse der Neuroneogenese umfassen die Bildung, die Wanderung, die Reifung und das Überleben neugebildeter Neurone. Diese entstehen aus multipotenten Stammzellen, den Neuralen Stammzellen. Neben Neuronen können sich diese auch im Bereich des ZNS in Astrocyten und Oligodendrocyten differenzieren. Während der embryonalen Entwicklung werden neuronale und gliale Zellen im Überfluss generiert. Durch den Prozess der Apoptose sind Vertebraten in der Lage, diese im Überfluss generierten Zellen z. B. durch die Ausschüttung neurotropher Faktoren vom Zielgewebe absterben zu lassen und so ein geeignetes Gleichgewicht herzustellen (Hamburger, 1992, 1993; Buss und Oppenheim, 2004).

### 4.1 Funktionelle Analyse von Bag-1 in PC12 Zellen

Für die funktionelle Analyse der Maus-Isoformen Bag-1S und Bag-1L, wurden beide Isoformen in einer neuronalen Zelllinie aus der Ratte, Phaeochromozytoma Zelllinie 12 (PC12), exprimiert. Diese Zellen sind ein beliebtes *in vitro* Model für die Analyse von neuronalen Differenzierungsprozessen. Sie proliferieren in serumhaltigem Medium. Durch die Gabe von Nerve Growth Factor (NGF) stoppen sie die Proliferation und beginnen Fortsätze auszuwachsen, die denen primärer Zellkulturen von sympathischen Neuronen ähneln. Außerdem synthetisieren sie verschiedene Neurotransmitter (Greene und Tischler, 1978).

Die Überexpression von Bag-1S und Bag-1L in PC12 Zellen zeigt unterschiedliche Effekte in ihrer subzellulären Lokalisation und im Neuritenwachstum nach Stimulation mit NGF. Bag-1S, welches vorwiegend ubiquitär exprimiert wird, führt zu einer Reduktion des Neuritenwachstums. Dagegen hat das nukleär exprimierte Bag-1L keinen Einfluss auf das Wachstum von Neuriten. Bag-1L besitzt am N-terminus eine nukleäre Lokalisationssequenz, die es ihm ermöglicht im Zellkern unabhängig von anderen Proteinen exprimiert zu werden (Zeiner und Gehring, 1995; Packham et al., 1997). Eine Punktmutation (R182A für Bag-1S, R318A für Bag-1L) innerhalb der Bag-Domäne beider Isoformen verhindert die Interaktion mit dem Chaperon Heat Shock Protein 70 (Hsp70). Die Überexpression dieser mutanten Isoform Bag-1Lm zeigt weder eine Änderung der nukleären Lokalisation noch einen Einfluss auf das Neuritenwachstum. Die mutante Bag-1S Isoform (Bag-1Sm) wird im Vergleich zu Bag-1S jedoch vorwiegend im Zytoplasma exprimiert und nicht im Zellkern. Bag-1Sm

transfizierte PC12 Zellen zeigen darüber hinaus ein längeres Neuritenwachstum. Die gestörte Interaktion zwischen Bag-1Sm und Hsp70 verhindert, dass Bag-1Sm in den Zellkern gelangt. Hsp70 ist demnach ein Transporter-protein für Bag-1S, wie auch bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte (Zeiner und Gehring, 1995; Takayama et al., 1998; Kullmann et al., 1998).

Bag-1 nimmt aufgrund seiner vielen Interaktionspartner an unterschiedlichen zellulären Prozessen teil. Die in dieser Arbeit beobachteten Defekte im Neuritenwachstum von PC12 Zellen, die Bag-1S überexprimieren, scheinen auf den ersten Blick widersprüchlich. So gibt es Studien, die zeigen, dass die Überexpression von Bag-1 in anderen neuronalen Zelllinien Neuritenwachstum fördert (Kermer et al., 2002; Liman et al., 2005). Andere Studien zeigen auch, dass Proteine, die Überleben fördern bzw. Apoptose verhindern nicht zwangsläufig auch Neuritenwachstum fördern müssen. So führt die Überexpression von Bcl-2 in PC12 Zellen, dem bekanntesten Interaktionspartner von Bag-1, zu keinen Änderungen im Neuritenwachstum (Batistatou et al., 1993). Die Überexpression von Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (NAIP) verhindert, ebenso wie Bag-1S, das Neuritenwachstum in PC12 Zellen (Gotz et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass Bag-1 mit B-Raf, Akt und Hsp70 auch in PC12 Zellen einen Komplex bildet (Jablonka et al., 2004). Neben B-Raf ist Bag-1 auch in der Lage mit Raf-1 zu interagieren (Wang et al., 1996; Song et al., 2001). Diese Proteine fördern nicht nur neuronales Überleben, sondern sind auch in die Signalwege für Neuritenwachstum involviert. Dabei sind die Mitglieder der Raf-Familie die Hauptvermittler der von NGF ausgelösten Effekte bzgl. des Neuritenwachstums in sich entwickelnden senso-rischen Neuronen (Markus et al., 2002). Die Aktivierung von Raf-1 führt zu einem verstärkten Neuritenwachstum in PC12 Zellen, wenn es an der Membran lokalisiert ist. Eine Mutation in Serin 259 zu Alanin führt neben einer verstärkten Interaktion mit 14-3-3 Proteinen zur Aktivierung der MAPK und der Proliferation, aber nicht zur Förderung des Neuritenwachstums (Dhillon et al., 2003). Es wird angenommen, dass es durch die Überexpression von Bcl-2 zu einer verstärkten Rekrutierung des Komplexes aus Bag-1, Hsp70, Akt und B-Raf an den Mitochondrien kommt, was zu einem verstärkten zellulären Überleben führt, nicht aber zur Beeinflussung des Neuritenwachstums. Eine Überexpression von Bag-1S, welches in PC12 Zellen endogen ebenfalls an den Mitochondrien lokalisiert ist, könnte dazu führen, dass die Raf-Kinasen verstärkt dorthin rekrutiert werden und somit nicht genügend Mengen an der Zellmembran zur Verfügung

stehen, um das Wachstum von Neuriten zu fördern. Da das EGFP-Signal der überexprimierten Bag-1S Isoform zu stark ist, um zelluläre Strukturen wie die Mitochondrien genau zu erkennen, muss diese Schlussfolgerung als vorläufig betrachtet und durch weitere Forschungsarbeiten belegt werden. Eine Möglichkeit, den Einfluss von Bag-1S im Neuritenwachstum aufzuschlüsseln, könnte anhand von spezifischen Expressiononstrukturen erfolgen, die membran- und mitochondrialgebundenes Bag-1S exprimieren.

## 4.2 Funktionelle Analyse von Bag-1 in Neuralen Stammzellen

Neurale Stammzellen können aus verschiedenen Entwicklungsstadien des Gehirns isoliert und mit spezifischen Wachstumsfaktoren in Kultur gehalten werden. Durch diese Faktoren sind Neurale Stammzellen in der Lage zu proliferieren. Der Entzug der Faktoren führt dazu, dass sich Neurale Stammzellen in Neurone, Astrocyten und Oligodendrocyten differenzieren (Gage, 2000; Temple, 2001). Die Gabe von spezifischen neurotrophen Faktoren kann außerdem die Differenzierung der Neurale Stammzellen in die neuronale oder gliale Richtung beeinflussen (Barres et al., 1993; Mayer et al., 1994; Lachyankar et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass Bag-1 während der neuronalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt für die Differenzierung und das Überleben von Neuronen. Bag-1 wird während der embryonalen Entwicklung im gesamten Nervensystem exprimiert. In *in vitro* Experimenten führte die Überexpression von Bag-1 zu einer beschleunigten neuronalen Differenzierung (Kermer et al., 2002; Liman et al., 2005). *Bag-1* defiziente Mäuse sterben bereits um E13 und weisen massive Apoptose im Neuroepithelium und in der Leber auf. Der Komplex aus B-Raf, Hsp70 und Akt ist ebenso gestört wie die Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bad an Serin 136. Auch ist die Expression der IAP reduziert (Gotz und Wiese et al., 2005).

Für die funktionelle Analyse der Maus-Bag-1 Isoformen in Neuralen Stammzellen wurde das Überleben und das Differenzierungspotential von *Bag-1* *+/+* Neuralen Stammzellen mit *Bag-1* *-/-* Neuralen Stammzellen verglichen. Durch die Rückführung der Bag-1 Isoformen Bag-1S und Bag-1L sowie der mutanten Isoformen Bag-1Sm und Bag-1Lm in *Bag-1* *-/-* Neuralen Stammzellen wurde abschließend analysiert, welche Bag-1 Isoform eventuelle Defekte im Überleben und in der Differenzierung

Neurale Stammzellen rückgängig machen kann und somit einen direkten Einfluss auf diese zellulären Prozesse nimmt. In Neuralen Stammzellen, die E11.5 isoliert wurden, wurde hauptsächlich die Bag-1S Isoform exprimiert, Bag-1L dagegen wesentlich schwächer. Die subzelluläre Lokalisation von Bag-1 zeigte An-häufungen im Zytoplasma, die teilweise mit Mitochondrien kolokalisiert waren. Ebenso konnte eine sehr schwache nukleäre Lokalisation beobachtet werden. *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen wiesen im Vergleich mit *Bag-1*<sup>+/+</sup> Neuralen Stammzellen eine erhöhte Apoptose sowie Differenzierungsdefekte in Astrocyten und Oligodendrocyten auf. Auch war eine Reduktion der frühen postmitotischen Neurone zu beobachten. Jedoch waren die *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuralen Stammzellen in der Lage, durch die Gabe der neurotrophen Faktoren CNTF und LIF, in Astrocyten und Oligodendrocyten zu differenzieren. Demnach scheinen diese Defekte nicht durch eine Unterbrechung der Signalwege für die gliale Differenzierung verursacht zu werden, sondern durch eine erhöhte Apoptose. Die Rückführung von Bag-1S und Bag-1L in *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neurale Stammzellen führte zu einer Abnahme apoptotischer Zellen. Die mutanten Isoformen zeigten diesen Effekt nicht. Bag-1S und Bag-1Sm wurden im Zytoplasma und im Zellkern exprimiert, Bag-1L und seine Mutante ausschließlich nukleär. Demnach ist die überlebensfördernde Wirkung von Bag-1 unabhängig von seiner subzellulären Lokalisation, aber abhängig von der Interaktion mit Hsp70. Ein Einfluss auf die Differenzierung nach Rückführung der Isoformen konnte nicht beobachtet werden. Bag-1 interagiert mit Bcl-2 und verstärkt dessen anti-apoptotische Wirkung (Takayama et al., 1995; Wang et al., 1996). Des Weiteren bindet Bag-1 an B-Raf und Raf-1 und fördert deren Aktivität und somit zelluläres Wachstum und Überleben (Wang et al., 1996; Wang et al., 1996; Gotz und Wiese et al., 2005). Es wurde außerdem gezeigt, dass Bag-1 erforderlich ist für die mitochondriale Lokalisierung des Komplexes B-Raf, Akt und Hsp70 in Motoneuronen. In den *Bag-1*<sup>-/-</sup> Mäusen ist dieser Komplex gestört, ebenso wie die Phosphorylierung von Bad an Serin 136 (Gotz und Wiese et al., 2005). Mäuse, in denen die Serin-Reste 112, 136 und 155 durch Alanin ausgetauscht wurden, waren lebensfähig, zeigten jedoch einen erhöhten Zelltod nach apoptotischen Stimuli (Datta et al., 2002). Da die Phänotypen dieser Mäuse jedoch wesentlich schwächer sind als die der *Bag-1*<sup>-/-</sup> Mäuse, wird vermutet, dass die Phosphorylierung von Bad nicht das einzige Signal ist, welches neuronales Überleben beeinflusst. So ähneln sich *B-Raf*<sup>-/-</sup> und *Bag-1*<sup>-/-</sup> Mäuse in ihren Phänotypen wesentlich mehr. Beide zeigen einen embryonal lethalen Phänotyp

um E13, eine erhöhte Apoptose in neuronalen Zellen und eine Reduktion der IAP. Das Fehlen von Bag-1 scheint demnach nicht nur die Aktivierung von Bad zu beeinflussen, sondern auch die Signalkette über B-Raf zu den IAP (Wiese et al., 1999; Wiese et al., 2001; Gotz und Wiese et al., 2005). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl Bag-1S, -M (Human und Maus) als auch die humane Bag-1L Isoform in der Lage sind, Apoptose zu unterdrücken. Die anti-apoptotische Wirkung wird dabei über die Bag-Domäne vermittelt (Takayama et al., 1995; Bardelli et al., 1996; Clevenger et al., 1997; Schulz et al., 1997; Sekiya et al., 1997; Yawata et al., 1998; Yang et al., 1999; Yang et al., 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Maus-Isoformen in der Lage waren, die Apoptose in *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuronalen Stammzellen zu vermindern, trotz unterschiedlicher subzellulärer Lokalisationen. Jedoch ist die Interaktion von Bag-1 mit Hsp70 für diesen positiven Effekt notwendig, da die mutanten Isoformen nicht in der Lage waren, den erhöhten Zelltod zu reduzieren. Bag-1 ist demnach vermutlich in der Lage über verschiedene Signalwege zelluläres Überleben beeinflussen kann. Bag-1S könnte den gestörten Komplex aus B-Raf, Akt und Hsp70 in *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuronale Stammzellen wieder zusammenfügen, an den Mitochondrien lokalisieren, die Phosphorylierung von Bad bewirken und so der Zelle Überleben signalisieren. Bag-1L dagegen könnte im Zellkern über Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF- $\kappa$ B, die Transkription von anti-apoptotischen Proteinen, wie z. B. den IAP, beeinflussen. Um zu analysieren, wie die einzelnen Bag-1 Isoformen anti-apoptotische Signalwege beeinflussen, müsste nach erfolgter Rückführung der einzelnen Isoformen in *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuronale Stammzellen die Phosphorylierung von Bad sowie der Komplex nachgewiesen werden können. Die Analyse der mRNA anti-apoptotischer Proteine sowie NF- $\kappa$ B könnte Rückschlüsse auf den Einfluss von Bag-1 auf die Transkription liefern. Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass ein Zusammenspiel von mindestens Bag-1 und Hsp70 notwendig ist, um das Überleben Neuronaler Stammzellen zu sichern. Ein Einfluss von Bag-1 in der Differenzierung von Neuronalen Stammzellen konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Bag-1S und Bag-1L waren lediglich in der Lage das Überleben der *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuronale Stammzellen zu fördern, aber sie beschleunigten weder die Differenzierung noch forcierten sie die Neuronalen Stammzellen in die neuronale oder die gliale Richtung. Das Fehlen von Bag-1 hat keinen direkten Einfluss auf die Signalwege, die für die Differenzierung erforderlich sind.



### **4.3 Funktionelle Analyse von Bag-1 in der Modulation des Glucocorticoid Rezeptors in Neuralen Stammzellen**

Glucocorticoide sind in der Lage zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Überleben zu beeinflussen. So wird z. B. im Hippocampus die Neuroneogenese durch Gabe von Glucocorticoiden negativ beeinflusst (Kim et al., 2004). Andere Studien zeigten, dass hohe Dosen von Glucocorticoiden zum vermehrten Zelltod in den granulären Zellen des Hippocampus oder in T-Zellen des Immunsystems führen (Thompson, 1999; Haynes et al., 2001). Außerdem ist nachgewiesen, dass hohe Dosen von Glucocorticoiden zu Erinnerungsverlusten bei Menschen führen (Utto et al., 1993; Bremner, 1999). Bag-1 gilt als ein Schlüsselmolekül in diesen Prozessen, da es in der Lage ist mit verschiedenen nukleären Rezeptoren, wie dem GR, dessen Aktivierung durch die Gabe von Glucocorticoiden erfolgt, zu interagieren und in ihrer Aktivität zu beeinflussen (Schneikert et al., 1999; Cato und Mink, 2001). In diesem Zusammenhang wurden viele Studien durchgeführt, die sich auf die humanen Bag-1 Isoformen beziehen. Im Blickpunkt steht dabei die humane Bag-1M Isoform, die in der Lage ist, zusammen mit dem GR in den Zellkern zu translozieren. Dort bindet sie an die DNA und verhindert so, dass der GR, der auch an die DNA bindet, Transkriptionsprozesse beeinflusst. Auch ist Bag-1M in der Lage, zusammen mit einem Komplex aus Chaperonen und Co-Chaperonen, im Zytoplasma den GR in einer inaktiven Konformation zu halten (Hohfeld und Jentsch, 1997; Takayama et al., 1997; Zeiner et al., 1997; Bimston et al., 1998; Gebauer et al., 1998; Schneikert et al., 1999; Nollen et al., 2000; Kanelakis et al., 2000; Cato und Mink, 2001). Ebenso ist für die humane Bag-1L Isoform nachgewiesen, dass sie mit dem GR interagieren und wie Bag-1M an die DNA binden und somit die Aktivität des GR behindern kann. Die humane Bag-1S Isoform kann dies nicht. Sie besitzt weder ein NLS, um in den Zellkern wie Bag-1M unabhängig von Transporterproteinen zu translozieren, noch eine Domäne, wie Bag-1M oder Bag-1L um zum einen mit dem GR zu interagieren und zum anderen an die DNA zu binden (Kullmann et al., 1998; Schneikert et al., 1999; Schmidt, et al., 2003). In der Maus wurden bis dato nur zwei Bag-1 Isoformen identifiziert, die von einer mRNA translatiert werden, Bag-1S und Bag-1L (Packham et al., 1997). Aufgrund der hohen Homologie von Bag-1 innerhalb verschiedener

Arten lassen sich die Funktionen der humanen Isoformen vermutlich auch auf die Maus Isoformen übertragen.

Anhand des *in vitro* Modells der Neuralen Stammzellen wurden in dieser Arbeit der Einfluss von Glucocorticoiden auf das Überleben und die Bedeutung der Maus Isoformen in der Modulation des GR analysiert. Neurale Stammzellen wurden mit dem synthetischen Glucocorticoiden Dexamethason behandelt. Die Auswertung der kondensierten Zellkerne zeigte eine erhöhte Apoptose im Vergleich zu unbehandelten Neuralen Stammzellen. Die bisherigen Veröffentlichungen zeigten, dass eine Reduktion von Bag-1 zu einer Erhöhung der GR-Aktivität führt. Bei einer Behandlung von *Bag-1*  $-/-$  Neuralen Stammzellen würde man demnach auch eine Erhöhung der bereits in *Bag-1*  $+/+$  Neuralen Stammzellen beobachten Apoptose erwarten. Entgegen dieser Erwartung änderte sich die Apoptose jedoch nicht signifikant im Vergleich zu unbehandelten *Bag-1*  $-/-$  Neuralen Stammzellen. Vermutlich ist der Level an Apoptose in *Bag-1*  $-/-$  Neurale Stammzellen bereits zu hoch, so dass die Zellen nicht auf zusätzliche apoptotische Stimuli reagieren. So reagierten *Bag-1*  $-/-$  Neurale Stammzellen nicht signifikant auf Staurosporine mit erhöhter Apoptose (Daten nicht gezeigt). Staurosporine war aber in der Lage in  $+/+$  Neuralen Stammzellen Apoptose auszulösen (Daten nicht gezeigt; Tamm et al., 2004). Um genauere Aufschlüsse darüber zu erhalten, inwieweit Neurale Stammzellen auf Dexamethason reagieren oder nicht, wurde die nukleäre Translokation des GR analysiert. Die endogene Expression des GR zeigte in Neuralen Stammzellen auch ohne Dexamethason in einigen Zellen eine nukleäre Lokalisation. Diese subzelluläre Lokalisation konnte auch in anderen Studien gezeigt werden (van Steensel et al., 1995; Ji et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit, die Translokation des GR zu beobachten, bestand darin, diesen als rekombinantes GFP-Protein zu exprimieren. Die transiente Transfektion von Neuralen Stammzellen ist bislang, neben viraler Transfektion, nur mittels Elektroporation möglich. Dafür werden viele Zellen benötigt, so dass 2-3 Wochen alte Kulturen verwendet werden mussten. Das Signal von GR-GFP war in transient transfizierten Neuralen Stammzellen sehr schwach, außerdem war in allen Zellen ein starkes nukleäres und ein sehr schwaches zytoplasmatisches Signal zu sehen. Nach Behandlung mit Dexamethason konnte in einigen Zellen eine Translokation des GR beobachtet werden, in anderen aber auch nicht. Ein weiteres Problem bestand in der geringen Transfektionseffizienz des GR-GFP Plasmids, die eine statistische Auswertung nicht zuließ. Um zu sehen, ob der Grund hierfür am

Plasmid oder an den Neuronalen Stammzellen liegt, wurde das Plasmid auch in PC12 Zellen transient transfiziert (Daten nicht gezeigt). Dort war die Expression und auch die Translokation des Rezeptors in den Zellkern in allen Zellen zu beobachten, die Transfektionseffizienz lag nach 24 h bei 15,2 %. Warum der GR auch ohne Hormon bereits im Zellkern lokalisiert ist, ist bislang unbekannt. Es wird vermutet, dass dies Zelltyp-abhängig ist, wobei evtl. die Proteine, die Teil des Komplexes sind, die den GR im Zytoplasma halten, fehlen oder auch bereits physikalischer Stress, wie z. B. Scherkräfte, zu einer nukleären Lokalisation des GR führen kann (Sanchez et al., 1990; Sanchez, 1991; van Steensel et al., 1995; Ji et al., 2003). Eine andere Möglichkeit für die nukleäre Lokalisation des GR in Neuronalen Stammzellen könnte darin bestehen, dass ein Analog der humanen Bag-1M Isoform in Mäusen fehlt, die den Rezeptor im Zytoplasma hält. Die geringe Transfektionseffizienz, besonders in den *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuronalen Stammzellen deutet entweder auf einen vermehrten Zelltod durch die Überexpression des GR-GFP Plasmids oder auf einen Abbau des überexprimierten Proteins hin. *Bag-1*<sup>-/-</sup> Neuronale Stammzellen weisen im Vergleich zu *Bag-1*<sup>+/+</sup> Neuronale Stammzellen einen erhöhten Zelltod auf, so dass die Vermutung nahe liegt, dass dabei auch transfizierte Zellen absterben. Es gibt jedoch auch Studien, die zeigen, dass der GR über den Proteasom-Apparat nach Hormongabe abgebaut werden kann. Man vermutet, dass dies ein weiterer Mechanismus von Zellen ist, um die Antwort des GR auf Glucocorticoide zu kontrollieren (Wallace und Cidlowski, 2001; Deroo et al., 2002). Durch Blockierung des Proteasoms mit Hilfe spezifischer Inhibitoren, wie z. B. MG132, könnte analysiert werden, ob dieses auch für die Überexpression des GR in Neuronalen Stammzellen zutrifft. Die Kotransfektion der Bag-1 Isoformen mit dem GR deutet auf eine mögliche Interaktion von Bag-1L mit dem GR hin. Da dieses schon für die humane Bag-1L Isoform gezeigt wurde, war solch ein Ergebnis zu erwarten. Aufgrund der teils doch unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen des GR innerhalb der Neuronalen Stammzellen, der geringen Transfektionseffizienzen und dem Alter der Kulturen bleibt es fraglich, inwieweit Neuronale Stammzellen ein geeignetes Modell zur Analyse von Glucocorticoid-Signalwegen sind.

Da Bag-1 ein Schlüssel-Molekül in der GR-Faltung und -Aktivierung ist, wäre ein Maus-Modell, in dem Bag-1 in den neuronalen Strukturen fehlt, ideal für solche Analysen. *Bag-1* Defizienz führt jedoch zu massiver Apoptose und zu einem embryonal lethalen Phänotyp um E13 (Gotz und Wiese et al., 2005), der eine

Analyse im adulten Tier unmöglich macht. Die Generierung und Verkreuzung von geflochten *Bag-1* Tieren (*Bag-1* Gen ist von LoxP-Seiten flankiert) mit Cre-Mäusen (Expression der Cre-Rekombinase unter zellspezifischen Promotor), führt dazu, dass die Cre-Rekombinase in bestimmten Zelltypen an den LoxP-Seiten das *Bag-1* Gen ausschneidet und die Zelle *Bag-1* defizient ist (Strachan und Read, 1999; Nagy, 2000). In dieser Arbeit wurden für die Etablierung einer geeigneten Methode zur Analyse der Effekte von Glucocorticoiden auf den Hippokampus männliche B16-Mäuse verwendet. Eine einmalige Dexamethason-Injektion intraperitoneal führte bereits nach 24 Stunden und auch noch nach 72 Stunden zu einer signifikanten Abnahme der Neuroneogenese. Eine erhöhte Apoptose konnte nicht beobachtet werden. Bezüglich der Wirkung von Dexamethason auf hippokampale Strukturen, gibt es bislang unterschiedliche Ergebnisse (Reagan und McEwen, 1997). Einige Studien zeigen, dass Dexamethason zur Apoptose von granulären Zellen im DG, striatalen Neuronen und pyramidalen Neuronen der CA3 Region führt (Uno et al., 1994; Hassan et al., 1996; Reagan und McEwen, 1997; Sousa et al., 1999; Haynes et al., 2001; Chromemore et al., 2005). Andere Studien ergaben, dass Dexamethason nicht zu einer erhöhten Apoptose führt, jedoch die Proliferation der Neurogenese im Hippokampus beeinflusst (Tan et al., 2002; Kim et al., 2004; Sundberg et al., 2006). In allen Studien wurden unterschiedliche Ratten- und Mausstämme unterschiedlichen Alters verwendet. Die Dosen der jeweiligen Dexamethason-Injektionen schwanken von 20-100 µg/kg Körpergewicht. Auch die Anzahl und der Abstand der Dosen variierte. Die sehr unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien lassen vermuten, dass die Wirkung von Dexamethason auch noch von anderen Parametern abhängt, deren Einfluss zunächst genauer geklärt werden müsste, um abschließende Aussagen treffen zu können.

## 5. Literaturverzeichnis

Adams JM., Cory S. (2002): Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (6), 715-720.

Akner G., Wikstrom AC., Mossber K., Sundqvist KG, Gustafsson JA. (1994): Morphometric studies of the localization of the glucocorticoid receptor in mammalian cells and of glucocorticoid hormone-induced effects. *J. Histochem. Cytochem.* 42 (5), 645-657.

Alberti S., Demand J., Esser C., Emmerich N., Schild H., Hohfeld J. (2002): Ubiquitylation of bag-1 suggests a novel regulatory mechanism during sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J. Biol. Chem.* 278 (20), 18702-18703.

Alberti S., Esser C., Hohfeld J. (2003): Bag-1 – a nucleotide exchange factor of hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress & Chaperones* 8 (3), 225-231.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1994): Molecular biology of the cell. *Garland Publishing, Inc.* New York & London.

Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J., M., Tramontin A. D. (2001): A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 287-293.

Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo JM. (2002): Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 22 (3), 629-634.

Antoku K., Maser R. S., Scully W. J., Delch S. M., Johnson D. E. (2001): Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with bag-1 and suppressor of death domains protein. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 286, 1003-1010.

Arevalo J. C., Conde B., Hempstead B. L., Chao M. V., Martin-Zanca D., Perez P. (2000): TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol. Cell. Biol.* 20 (16), 5908-5916.

Barde Y. A. (2004): Death of injured neurons caused by the precursor of nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (16), 5703-5704.

Bardelli A., Longati P., Albero D., Goruppil S., Schneider C., Ponzetto C., Comoglio P. M. (1996): HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J.* 22, 6205-6212

Barres B. A., Schmid R., Sendtner M., Raff M. C. (1993): Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118, 283-295.

Batistatou A., Merry D. E., Korsmeyer S. J., Greene L. A. (1993): Bcl-2 affects survival but not neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Neurosci.* 13 (10), 4422-4428.

- Beato M., Herrlich P., Schutz G. (1995): Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851–857.
- Beato M., Candau R., Chavez S., Mows C., Truss M. (1996): Interaction of steroid hormone receptors with transcription factors involves chromatin remodelling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 56, 1-6.
- Beck C. A., Estes P. A., Bona B. J., Muro-Cacho C. A., Nordeen S. K., Edwards D. P. (1993): The steroid antagonist RU486 exerts different effects on the glucocorticoid and progesterone receptors. *Endocrinology* 133 (2), 728-740.
- Becker E., Soler R. M., Yuste V. J., Gine E., Sanz-Rodriguez C., Egea J., Martin-Zanca D., Comella J. X. (1998): Development of survival responsiveness to brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neurotrophin 4/5, but not to nerve growth factor, in cultured motoneurons from chick embryo spinal cord. *J. Neurosci.* 18 (19), 7903-7911.
- Benedetti M., Levi A., Chao M. V. (1993): Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (16), 7859-7863.
- Bender F. L., Fischer M., Funk N., Orel N., Rethwilm A., Sendtner M. (2006): High-efficiency gene transfer into cultured embryonic motoneurons using recombinant lentiviruses. *Histochem. Cell Biol.* Histochem Nov 11. (Epub ahead of print)
- Bibel M., Hoppe E., Barde Y. A. (1999): Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75<sup>NTR</sup>. *EMBO J.* 18 (3), 616-622
- Bimston D., Song J., Winchester D., Takayama S., Reed J. C., Morimoto R. I. (1998): BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. *EMBO J.* 23, 6871-6878.
- Bonni A., Brunet A., West A. E., Datta S. R., Takasu M. A., Greenberg M. E. (1999): Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286 (5443), 1358-1362.
- Bremner JD. (1999): Alterations in brain structure and function associated with post-traumatic stress disorder. *Semin. Clin. Neuropsychiatry* 4, 249-255.
- Briknarova K., Takayama S., Brive L., Havert M. L., Knee D. A., Velasco J., Homma S., Cabezas E., Stuart J., Hoyt D. W., Satterthwait A. C., Llinas M., Reed J. C., Ely K. R. (2001): Structural analysis of bag1 cochaperone and its interactions with Hsc70 heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* 8 (4), 349-352.
- Brimmell M., Burns J. S., Munson P., McDonald L., O'Hare M. J., Lakhani S. R., Packham G. (1999): High level expression of differentially localized bag-1 isoforms in some oestrogen receptor-positive human breast cancers. *Br. J. Cancer* 81 (6), 1042-1051.

- Brive L., Takayama S., Briknarova K., Homma S., Ishida S. K., Reed J. C., Ely K. R. (2001): The carboxyl-terminal lobe of hsc70 ATPase domain is sufficient for binding to bag1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (5), 1099-1105.
- Bronner-Fraser M., Wolf J. J., Murray B. A. (1992): Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. *Dev. Biol.* 153 (2), 291-301.
- Brunner R., Schaefer D., Hess K., Parzer P., Resch F., Schwab S. (2005): Effect of corticosteroids on short-term and long-term memory. *Neurology* 2, 335-337.
- Bukau B., Weissman J., Horwich A. (2006): Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-451.
- Buss R. R., Oppenheim R. W. (2004): Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. *Anat. Sci. Intern.* 79, 191-197.
- Calof A. L., Lander A. D. (1991): Relationship between neuronal migration and cell-substratum adhesion: laminin and merosin promote olfactory neuronal migration but are anti-adhesive. *J. Cell. Biol.* 115, 779-794.
- Calof A. L., Campanero M. R., O'Rear J. J., Yurchenco P. D., Lander A. D. (1994): Domain-specific activation of neuronal migration and neurite outgrowth-promoting activities of laminin. *Neuron* 13 (1), 117-130.
- Cameron H. A., Gould E. (1994): Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61 (2), 203-209.
- Cameron H. A., McKay R. (1998): Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr. Biol.* 8, 677-680.
- Cameron H. A., McKay R. (1999): Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat. Neurosci.* 2 (10), 894-897.
- Cameron H. A., McKay R. D. (2001): Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 435 (4), 406-417.
- Carter B. D., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B., Offenhauser N., Bohm-Matthaei R., Baeuerle P. A., Barde Y. A. (1996): Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272 (5261), 542-545.
- Cato A. C. B., Mink S. (2001): Bag-1 family of cochaperones in the modulation of nuclear receptor action. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.* 78, 379-388.
- Chai J., Du C., Wu JW., Kyin S., Wang X., Shi Y. (2000): Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406 (6798), 855-862.
- Chang J. H., Mellon E., Schanen N. C., Twiss J. L. (2003): Persistent TrkA activity is necessary to maintain transcription in neuronally differentiated PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 278 (44), 42877-42885.

- Chao M. V., Hempstead B. L. (1995): p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18 (7), 321-326.
- Chao M. V. (2000): Trophic Factors: An evolutionary cul-de-sac or door into higher neuronal function? *J. Neurosci. Res.* 59, 353-355.
- Chao, M. (2003): Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 299-309.
- Chen S., Smith D. F. (1998): Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 273 (52), 35194-200
- Cheng E. H., Wei M. C., Weiler S., Flavell R. A., Mak T. W., Lindsten T., Korsmeyer S. J. (2001): Bcl-2, bcl-x(l) sequester bh3 domain-only molecules preventing bax- and bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell.* 8 (3), 705-711.
- Chromemore C., Lu J., Qu Y., Liposits Z., Sousa N., Holsboer F., Almeida OFX. (2005): Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. *Mol. Psychiatry* 10, 790-798.
- Clarke P. G. H. (1999): Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181, 195-213.
- Clevenger C. V., Thickman K., Ngo W., Chang W. P., Takayama S., Reed J. C. (1997): Role of bag-1 in the survival and proliferation of the cytokine-dependent lymphocyte lines, Ba/F3 and Nb2. *Mol. Endocrinol.* 11 (5), 608-18.
- Coe C. L., Kramer M., Czeh B., Gould E., Reeves A. J., Kirschbaum C., Fuchs E. (2003): Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol. Psychiatry* 54 (10), 1025-1034.
- Cohen S., Levi-Montalcini R., Hamburger R. (1954): A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40, 1014-1018.
- Connell P., Ballinger C. A., Jiang J., Wu Y., Thompson L. J., Hohfeld J., Patterson C. (2001): The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell. Biol.* 3 (1), 93-96.
- Conrad CD., McEwen BS (1997): The effects of Type I and Type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behaviour and spatial memory in the Y-maze. *Brain Res.* 759, 76-83.
- Cory S., Adams JM. (2002): The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2 (9), 647-656.
- Crocoll A., Blum M., Cato A. C. B. (2000): Isoform-specific expression of bag-1 in mouse development. *Mechan. Develop.* 91, 355-359.
- Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M. E. (1997): Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91 (2), 231-241.



Datta S. R., Brunet A., Greenberg M. E. (1999): Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13 (22), 2905-2927.

Datta S. R., Ranger A. M., Lin M. Z., Sturgill J. F., Ma Y. C., Cowan C. W., Dikkes P., Korsmeyer S. J., Greenberg M. E. (2002): Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev. Cell* 3 (5), 631-643.

Dechant G., Biffo S., Okazawa H., Kolbeck R., Pottgiesser J., Barde Y. A. (1993): Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development* 119 (2), 545-558.

Dechant G., Barde Y. A. (2002): The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat. Neurosci.* 5 (11), 1131-1136.

De Kloet E. R., Oitzl M. S., Joels M. (1999): Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* 22, 422-426.

Demand J., Alberti S., Patterson C., Hohfeld J. (2001): Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr. Biol.* 11, 1569-1577.

Deroo B. J., Rentsch C., Sampath S., Young J., DeFranco D. B., Archer T. K. (2002): Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking. *Mol. Cell. Biol.* 22 (12), 4113-4123.

De Quervain D. J.F., Roozendaal B., McGaugh J. L. (1993): Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.

Deveraux Q. L., Reed J. C. (1999): IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13 (3), 239-252.

Dhillon A. S., Meikle S., Peyssonnaud C., Grindlay J., Kaiser C., Steen H., Shaw P. E., Mischak H., Eychene A., Kolch W. (2003): A Raf-1 mutant that dissociates MEK/extracellular signal-regulated kinase activation from malignant transformation and differentiation but not proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 23 (6), 1983-1993.

Diamond D. M., Fleschner M., Ingersoll N., Rose G. M. (1996): Psychological stress impairs spatial working memory: relevance to electrophysiological studies of hippocampal function. *Behav. Neurosci.* 110, 661-672.

Diamond D. M., Park C. R., Heman K. L., Rose G. M. (1999): Exposing rats to a predator impairs spatial working memory in the radial arm water maze. *Hippocampus* 9, 542-552.

Diez del Corral R., Storey K. G. (2001): Markers in vertebrate neurogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 835-839.

Dittmar K. D., Pratt W. B. (1997 a): Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J. Biol. Chem.* 272 (20), 13047-13054.

Dittmar K. D., Demady D. R., Stancato L. F., Krishna P., Pratt W. B. (1997 b): Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor.hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. *J. Biol. Chem.* 272 (34), 21213-21220.

Dittmar KD, Banach M, Galigniana MD, Pratt WB. (1998): The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J. Biol. Chem.* 273 (13), 7358-7366.

Dityatev A., Schachner M. (2003): Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (6), 456-468.

Doong H., Vrailas A., Kohn E. C. (2002): What's in the `Bag'? – a functional domain analysis of the bag-family proteins. *Cancer Letters* 188, 25-32.

Edgar D., Timpl R., Thoenen H. (1984): The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J.* 3 (7), 1463-1468.

Eichenbaum H. A. (2000): A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 41-50.

Esposito D., Patel P., Stephens R. M., Perez P., Chao M. V., Kaplan D. R., Hempstead B. L. (2001): The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 276 (35), 32687-32695.

Fishman R. B., Hatten M. E. (1993): Multiple receptor systems promote CNS neural migration. *J. Neurosci.* 13 (8), 3485-3495.

Foehr E. D., Lin X., O'Mahony A., Gleziunas R., Bradshaw R. A., Greene W. C. (2000): NF- $\kappa$ B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J. Neurosci.* 20 (20), 7556-7563.

Forger N. G., Prevet D., deLapeyriere O., de Bovis B., Wang S., Bartlett P., Oppenheim R. W. (2003): Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J. Neurosci.* 23 (26), 8854-8858.

Freeman B. C., Toft D. O., Morimoto R. I. (1996): Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* 274 (5293), 1718-1720.

Froesch B. A., Takayam S., J. C. Reed (1998): Bag-1L protein enhances androgen receptor function. *J. Biol. Chem.* 273 (19), 11660-11666.

Gabrieli J. D. E. (1998): Cognitive neuroscience of human memory. *Annu. Rev. Psychol.* 49, 87-115.

Gage F. H. (2000): Mammalian neural stem cells. *Science* 287 (5457), 1433-1438.

Gassler C. S., Wiederkehr T., Brehmer D., Bukau B., Mayer M. P. (2001): Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor. *J. Biol. Chem.* 276 (35), 32538-32544.

Gebauer M., Zeiner M., Gehring U. (1998): Interference between proteins Hsp46 and Hop/p60, which bind to different domains of the molecular chaperone hsp70/hsc70. *Mol. Cell. Biol.* 18 (11), 6238-6244.

Greene L. A., Tischler A. S. (1976): Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (7), 2424-2428.

Greene L. A., Tischler A. S. (1978): Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Lab. Invest.* 39 (2), 77-89.

Gotz R., Karch C., Digby M. R., Troppmair J., Rapp U. R., Sendtner M. (2000): The neuronal apoptosis inhibitory protein suppresses neuronal differentiation and apoptosis in PC12 cells. *Hum. Mol. Gen.* 9 (17), 2479-2489.

Gotz R., Wiese S., Takayama S., Camarero G. C., Rossoll W., Schweizer U., Troppmair J., Jablonka S., Holtmann B., Reed J. C., Rapp U. R., Sendtner M. (2005): Bag1 is essential for differentiation and survival of hematopoietic and neuronal cells. *Nat. Neurosci.* 8 (9), 1169-1178.

Gould E., McEwen B. S., Tanapat P., Galea L. A., Fuchs E. (1997): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 17, 2492-2498.

Gross A., Yin X. M., Wang K., Wei M. C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Korsmeyer S. J. (1999): Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274 (2), 1156-1163.

Hamburger V. (1992): History of the discovery of neuronal death in embryos. *J. Neurobiol.* 23 (9), 1116-23.

Hamburger V. (1993): The history of the discovery of the nerve growth factor. *J. Neurobiol.* 24(7):893-897.

Hassan A. H. S., von Rosenstiel R., Patchev V. K., Holsboer F., Almeida O. F. X. (1996): Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp. Neurology* 140, 43-52.

- Haynes L. E., Griffiths M. R., Hyde R. E., Barber D. J., Mitchell I. J. (2001): Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. *Neuroscience* 104, 57-69.
- Haynes L. E., Lendon C. L., Barber D. J., Mitchell I. J. (2003): 17-oestradiol attenuates dexamethasone-induced lethal and sublethal neuronal damage in the striatum and hippocampus. *Neuroscience* 120, 799-806.
- Hemmings B. A. (1997): Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* 275 (5300), 628-630.
- Hempstead B. L., Martin-Zanca D., Kaplan D. R., Parada L. F., Chao M. V. (1991): High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350 (6320), 678-683.
- Hibberd C., Yau J. L. W., Seckl J. R. (2000): Glucocorticoids and the ageing hippocampus. *J. Anat.* 197, 553-562.
- Hohfeld J., Minami Y., Hartl F. U. (1995): Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83 (4), 589-598.
- Hohfeld J., Jentsch S. (1997 a): GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein bag-1. *EMBO J.* 16, 6209-6216.
- Hohfeld J., Jentsch S. (1997 b): GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J.* 16 (20), 6209-6216.
- Hohfeld J. (1998): Regulation of the heat shock conjugate hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein bag-1 provides novel insights. *Biol. Chem.* 379, 269-274.
- Huang L., Mivechi N. F., Moskophidis D. (2001): Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: analysis of mice with targeted gene disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 gene. *Mol. Cell. Biol.* 21 (24), 8575-8591.
- Huang E. J., Reichardt L. F. (2001): Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677-736.
- Jablonka S., Wiese S., Sendtner M. (2004): Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J. Neurobiol.* 58, 272-286.
- Jackson T. R., Blader I. J., Hammonds-Odie L. P., Burga C. R., Cooke F., Hawkins P. T., Wolf A. G., Heldman K. A., Theibert A. B. (1996): Initiation and maintenance of NGF-stimulated neurite outgrowth requires activation of a phosphoinositide 3-kinase. *J. Cell. Science* 109, 289-300.
- Jankovski A., Sotelo C. (1996): Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J. Comp. Neurol.* 371 (3), 376-396.

- Jesenberger V., Jentsch S. (2002): Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 112-121.
- Ji J. Y., Jing H., Diamond S. L. (2003): Shear stress causes nuclear localization of endothelial glucocorticoid receptor and expression from the GRE promoter. *Circulation Res.* 92, 279-283.
- Jiang J., Ballinger C. A., Wu Y., Dai Q., Cyr D. M., Hohfeld J., Patterson C. (2001): CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* 276 (46), 42938-42944.
- Joels M., de Kloet E. R. (1990): Mineralcorticoid receptor-mediated changes in membrane properties of rat CA1 pyramidal neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4497-4498.
- Joels M. (2001): Corticosteroid actions in the hippocampus. *J. Neuroendocrinol.* 13, 657-669.
- Johnson B. D., Schumacher R. J., Ross E. D., Toft D. O. (1998): Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273 (6), 3679-3686.
- Ito H., Nomoto H., Furukawa S. (2003): Growth Arrest of PC12 Cells by nerve growth factor is dependent on the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway via p75 neurotrophin receptor. *J. Neurosci. Res.* 72, 211-217.
- Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D., Smith A. E. (1984): A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.
- Kanelakis K. C., Murphy P. J., Galigniana M. D., Morishima Y., Takayama S., Reed J. C., Toft D. O., Pratt W. B. (2000): hsp70 interacting protein Hip does not affect glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery except to oppose the effect of BAG-1. *Biochemistry* 39 (46), 14314-14321.
- Kaplan D. R., Martin-Zanca D., Parada L. F. (1991): Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350 (6314), 158-160.
- Kaplan D. R., Hempstead B. L., Martin-Zanca D., Chao M. V., Parada L. F. (1991): The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252 (5005), 554-558.
- Kaplan D. R., Miller F. D. (2000): Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10 (3), 381-391.
- Kermer P., Krajewska M., Zapata J. M., Takayama S., Mai J., Krajewski S., Reed J. C. (2002): Bag1 is a regulator and marker of neuronal differentiation. *Cell Death Differ.* 9 (4), 405-413.
- Kim J. J., Yoon K. S. (1998): Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 21, 505-509.

- Kim J. J., Diamond D. M. (2002): The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 453-462.
- Kim J. B., Ju J. Y., Kim J. H., Kim- TY., Yang BH., Lee YS., Son H. (2004): Dexamethasone inhibits proliferation of adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *Brain Res.* 1027, 1-10.
- Knee D. A., Froesch B. A., Nuber U., Takayama S., Reed J. C. (2001): Structure-function analysis of Bag1 proteins. *J. Biol. Chem.* 276 (16), 12718-12724.
- Kolch W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* 351, 289-305.
- Kudoh M., Knee D. A., Takayama S., Reed J. C. (2002): Bag1 proteins regulate growth and survival of ZR-75-1 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 62 (6), 1904-1909.
- Kuhn H. G., Dickinson-Anson H., Gage F. H. (1996): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16 (6), 2027-2033.
- Kullmann M., Schneikert J., Moll J., Heck S., Zeiner M., Gehring U., Cato A. C. B. (1998): Rap46 is a negative regulator of glucocorticoid receptor action and hormone-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273 (23), 14620-14625.
- Lachyankar M. B., Condon P. J., Quesenberry P. J., Litofsky N. S., Recht L. D., Ross A. H. (1997): Embryonic precursor cells that express Trk receptors: Induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3 and CNTF. *Exp. Neurology* 144, 350-360.
- Lallier T., Bronner-Fraser M. (1991): Avian neural crest cell attachment to laminin: involvement of divalent cation dependent and independent integrins. *Development* 113 (4), 1069-1084.
- Lallier T., Deutzmann R., Perris R., Bronner-Fraser M. (1994): Neural crest cell interactions with Laminin: Structural requirements and localization of the binding site for  $\alpha 1\beta 1$  integrin. *Developmental Biology* 162, 451-464.
- Lee AL., Ogle WO., Sapolsky RM. (2002): Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disorders.* 4, 117-128.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S., Wang X. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 (4), 479-489.
- Liesi P. (1985): Do neurons in the vertebrate CNS migrate on laminin? *EMBO J.* 4 (5), 1163-1170.
- Liesi P., Seppala I., Trenkner E. (1992): Neuronal migration in cerebellar microcultures is inhibited by antibodies against a neurite outgrowth domain of laminin. *J. Neurosci. Res.* 33 (1), 170-176.

- Liesi P., Hager G., Dodt H. U., Seppala I., Zieglgansberger W. (1995): Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. *J. Neurosci. Res.* 40 (2), 199-206.
- Liman J., Ganesan S., Dohm C. P., Krajewski S., Reed J. C., Bähr M., Wouters F. S., Kermer P. (2005): Interaction of bag1 and hsp70 mediates neuroprotectivity and increases chaperone activity. *Mol. Cell. Biol.* 25 (9), 3715-3725.
- Lin J., Hutchinson L., Gaston S. M., Raab G., Freeman M. R. (2001): BAG-1 is a novel cytoplasmic binding partner of the membrane form of heparin-binding EGF-like growth factor: a unique role for proHB-EGF in cell survival regulation. *J. Biol. Chem.* 276 (32), 30127-30132.
- Liu R., Takayama S., Zheng Y., Froesch B., Chen G. Q., Zhang X., Reed J. C., Zhang X. K. (1998): Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 273 (27), 16985-16992.
- Lledo PM., Alonso M., Grubb M. S. (2006): Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 179-193.
- Lois C., Alvarez-Buylla A. (1994): Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264 (5162), 1145-1148.
- Lonze B. E., Ginty D. D. (2002): Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35 (4), 605-623.
- Luine V. N., Spencer R. L., McEwen B. S. (1993): Effects of chronic corticosterone ingestion on spatial memory performance and hippocampal serotonergic function. *Brain Res.* 616, 65-70.
- Luders J., Demand J., Schonfelder S., Frie M., Zimmermann R., Hohfeld J. (1998): Cofactor-induced modulation of the functional specificity of the molecular chaperone Hsc70. *Biol. Chem.* 379 (10), 1217-1226.
- Luders J., Demand J., Papp O., Hohfeld J. (2000 a): Distinct isoforms of the cofactor Bag-1 differentially affect Hsc70 chaperone function. *J. Biol. Chem.* 275 (20), 14817-14823.
- Luders J., Demand J., Hohfeld J. (2000 b): The ubiquitin-related bag-1 provides a link between the molecular chaperones hsc70/hsp70 and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 275 (7), 4613-4617.
- Mahadeo D., Kaplan L., Chao M. V., Hempstead B. L. (1994): High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J. Biol. Chem.* 269 (9), 6884-6891.

- Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R. M. (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 (6), 835-839.
- Markakis E. A., Gage F. H. (1999): Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J. Comp. Neurol.* 406 (4), 449-460.
- Markus A., Zhong J., Snider W. D. (2002): Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* 35 (1), 65-76.
- Mattson M. P. (2000): Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1, 120-129.
- Mayer M., Kishore B., Noble M. (1994): Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro. *Develop.* 120, 143-153
- McCullers D. L., Sullivan P. G., Scheff S. W., Herman J. P. (2002): Mifepristone protects CA1 hippocampal neurons following traumatic brain injury in rat. *Neuroscience* 109 (2), 219-230.
- McEwen B. S., Sapolsky R. M. (1995): Stress and cognitive function. *Cur. Opin. Neurobiol.* 5, 205-216.
- McEwen B. S. (1998): Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. N Y Acad. Sci.* 840, 33-44.
- McEwen B. S. (1999): Stress and the aging hippocampus. *Frontiers Neuroendocrinol.* 20, 49-70.
- McEwen B.S. (2000): Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol. Psychiatry* 48, 721-731.
- Miller D. B., O'Callaghan J. P. (2002): Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism* 51 (6), 5-10.
- Miller D. B., O'Callaghan J. P. (2005): Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res. Rev.* 4, 123-140.
- Montaron M. F., Drapeau E., Dupret D., Kitchener P., Aurousseau C., Le Moal M., Piazza P. V., Abrous D. N. (2006): Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol. Aging.* 27 (4), 645-654.
- Morishima Y., Murphy P. J. M., Li DP., Sanchez E. R., Pratt W. B. (2000): Stepwise assembly of a glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex resolves two sequential ATP-dependent events involving first hsp70 and then hsp90 in opening of the steroid binding pocket. *J. Biol. Chem.* 275 (24), 18054-18060.



- Morris R. G. M., Anderson E., Lynch G. S., Baudry M. (1986): Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D- aspartate receptor antagonist, APV. *Nature* 319, 774-776.
- Moser E. I., Krobot K. A., Moser M. B., Morris R. G. M. (1998): Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* 28, 2038-2042.
- Mowla S. J., Farhadi H. F., Pareek S., Atwal J. K., Morris S. J., Seidah N. G., Murphy R. A. (2001): Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* 276 (16), 12660-12666.
- Murata S., Minami Y., Minami M., Chiba T., Tanaka K. (2001): CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* 2 (12), 1133-1138.
- Nagata S. (1999): Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33, 29-55.
- Nagy A. (2000). Cre Rekombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109.
- Newcomer J. W., Craft S., Hershey T., Askins K. Bardgett M. E. (1994): Glucocorticoid-induced impairment in declarative memory performance in adult human. *J. Neurosci.* 14, 2047-2053.
- Niyaz Y., Frenz I., Petersen G., Gehring U. (2003): Transcriptional stimulation by the DNA binding protein Hap46/Bag-1M involves hsp70/hsc70 molecular chaperones. *Nucleic Acids Res.* 31 (8), 2209-2216.
- Nollen E., Brunsting J. F., Song J., Kampinga H. H., Morimoto R. I. (2000): Bag1 functions in vivo as negative regulator of hsp70 chaperone activity. *Mol. Cell. Biol.* 20 (3) 1083-1088.
- Nollen E., Kabakov A. E., Brunsting J. F., Kanon B., Hohfeld J., Kampinga H. H. (2001): Modulation of in vivo hsp70 chaperone activity by hip and bag-1. *J. Biol. Chem.* 276 (7), 4677-4682.
- Nollen E., Morimoto R. I. (2002): Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J. Cell Sci.* 115, 2809-2816.
- O'Keefe J., Nadel L. (1978): The hippocampus as a cognitive map. *Oxford Univ. Press*, New York.
- O'Gorman S., Dagenais N. A., Qian M., Marchuk Y. (1997): Protamine-Cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14602-14607.
- Oppenheim R. W., Houenou L. J., Parsadanian A. S., Pevette D., Snider W. D., Shen L. (2000): Glial cell line-derived neurotrophic factor and developing mammalian motoneurons: regulation of programmed cell death among motoneuron subtypes. *J. Neurosci.* 20 (13), 5001-5011.

- Oppenheim R. W., Wiese S., Prevet D., Armanini M., Wang S., Houenou L. J., Holtmann B., Gotz R., Pennica D., Sendtner M. (2001): Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *J. Neurosci.* 21 (4), 1283-1291.
- Packham G., Brimmel M., Cleveland J. L. (1997): Mammalian cells express two differentially localized bag-1 isoforms generated by alternative translation initiation. *J. Biochem.* 328, 807-813.
- Peter M. E., Krammer P. H. (2003): The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10 (1), 26-35.
- Peterson G., Hahn C., Gehring U. (2001): Dissection of the ATP-binding domain of the chaperone hsc70 for interaction with the cofactor Hap46. *J. Biol. Chem.* 276 (13), 10178-10184.
- Pixley S. K., Cotman C. W. (1986): Laminin supports short-term survival of rat septal neurons in low-density, serum-free cultures. *J. Neurosci. Res.* 15 (1), 1-17.
- Porter B. E., Weis J., Sanes J. R. (1995): A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin. *Neuron* 14 (3), 549-559.
- Powell S. K., Kleinman H. K. (1997): Neuronal laminins and their cellular receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (3), 401-414.
- Pu S. F., Zhuang H. X., Marsh D. J., Ishii D. N. (1999): Time-dependent alteration of insulin-like growth factor gene expression during nerve regeneration in regions of muscle enriched with neuromuscular junctions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 63 (2), 207-16.
- Rakic P. (2002): Adult neurogenesis in mammals: an identify crisis. *J. Neurosci.* 22, 614-618.
- Reagan L. P. und McEwen B. S. (1997): Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J. Chem. Neuroanatomy.* 13, 149-167.
- Reichardt L. F., Tomaselli K. J. (1991): Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 531-570.
- Reul J. M. H. M., de Kloet E. R. (1985): Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117, 2505-2511.
- Riedl S. J., Shi Y. (2004): Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 897-907.
- Rivas R. J., Hatten M. E. (1995): Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 15 (2), 981-999

- Rodriguez J. J., Montaron M. F., Petry K. G., Arousseau C., Marinelli M., Premier S., Rougon G., Le Moal M., Abrous D. N. (1998): Complex regulation of the expression of the polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule by glucocorticoids in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 10 (9), 2994-3006.
- Robbins J., Dilworth S. M., Laskey R. A., Dingwall C. (1991): Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64 (3), 615-623.
- Roth W., Grimm C., Rieger L., Strik H., Taakayama S., Krajewski S., Meyermann R., Dichgans J., Reed J. C., Weller M. (2000): Bag-1 and bcl-2 gene transfer in malignant glioma: modulation of cell cycle regulation and apoptosis. *Brain Pathol.* 10, 223-234.
- Roy M., Sapolsky R. M. (1997): The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis. *Neuroendocrinology* 77, 24-31.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Scienc.* 230 (4732), 1350-1354.
- Sanchez E. R., Hirst M., Scherrer L. C., Tang H.Y., Welsh M. J., Harmon J. M., Stoney Simons S., Ringold G. M., Pratt W. B. (1990): Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90. *J. Biol. Chem.* 265 (33), 20123-20130.
- Sanchez E. R. (1991): Heat shock induces translocation to the nucleus of the unliganded glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 267 (1), 17-20.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (12), 5463-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Sapolsky R. M. (1992): Stress, the aging brain and the mechanisms of neuron death. *MIT Press*, Cambridge, Massachusetts.
- Sapolsky R. M. (2000): Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 925-935.
- Schauwecker PE. (2006): Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of two strains of adult mice. *Brain Res.* 1120 (1), 83-92.
- Schmidt U., Wochnik G. M., Rosenhagen M. C., Young J. C., Hartl F. U., Holsboer F., Rein T. (2003): Essential role of the unusual DNA-binding motif of BAG-1 for inhibition of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 278 (7), 4926-4931.

- Schneikert J., Hubner S., Martin E., Cato A. C. (1999): A nuclear action of the eukaryotic cochaperone RAP46 in downregulation of glucocorticoid receptor activity. *J. Cell. Biol.* 146 (5), 929-940.
- Schropel A., von Schack D., Dechant G., Barde Y. A. (1995): Early expression of the nerve growth factor receptor *ctrkA* in chick sympathetic and sensory ganglia. *Mol. Cell. Neurosci.* 6 (6), 544-566.
- Schulz J. B., Bremen D., Reed J. C., Lommatzsch J., Takayam S., Wüllner U., Löschmann P. A., Klockgether T., Weller M. (1997): Cooperative interception of neuronal apoptosis by *bcl-2* and *bag-1* expression: prevention of caspase activation and reduced production of reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 69, 2075-2086.
- Scoville W. B., Milner B. (1957): Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20 (1), 11-21.
- Sekiya M., Adachi M., Takayama S., Reed J. C., Imai K. (1997): IFN-gamma upregulates anti-apoptotic gene expression and inhibits apoptosis in IL-3-dependent hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239 (2), 401-406.
- Sendtner M., Kreutzberg G. W., Thoenen H. (1990): Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345 (6274), 440-441.
- Sendtner M., Holtmann B., Hughes R. A. (1996): The response of motoneurons to neurotrophins. *Neurochem. Res.* 21 (7), 831-841.
- Sendtner M., Pei G., Beck M., Schweizer U., Wiese S. (2000): Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res.* 301, 71-84.
- Shatkina L., Mink S., Rogatsch H., Klocker H., Langer G., nestl A., Cato A. C. B. (2003): The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH<sub>2</sub>-terminal region of the receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23 (20), 7189-7197.
- Shi Y. (2002): Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell.* 9 (3), 459-470.
- Smeyne R. J., Klein R., Schnapp A., Long L. K., Bryant S., Lewin A., Lira S. A., Barbacid M. (1994): Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted *Trk/NGF* receptor gene. *Nature* 368 (6468), 246-249.
- Sondermann H., Ho A. K., Listenberger L. L., Siegers K., Moarefi I., Wente S. R., Hartl F. U., Young J. C. (2001): Prediction of novel *bag-1* homologs based on structure/function analysis identifies *snl1p* as an hsp70 co-chaperone in *S. Cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277 (36), 33220-33227.
- Song J., Takeda M., Morimoto R. I. (2001): Bag-1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat. Cell Biol.* 3, 276-282.

- Sousa N., Paula-Barbosa MM., Almeida OFX. (1999): Ligand and subfield specificity of corticoid-induced neuronal loss in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 89, 1079-1087.
- Squire L. R., Zola-Morgan S. (1991): The medial temporal lobe memory system. *Science* 253 (5026), 1380-1386.
- Srinivasula S. M., Datta P., Fan X. J., Fernandes-Alnemri T., Huang Z., Alnemri E. S. (2000): Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 275 (46), 36152-36157.
- Stanfield B. B., Trice J. E. (1988): Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain Res.* 72 (2), 399-406.
- Starkman M. N., Gebarski S. S., Berent S., Schteingart D. E. (1992): Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol. Psychiatry* 32, 756-765.
- Starkman MN., Giordani B., Gebarski SS. (1999): Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol. Psychiatry* 46, 1595-1602.
- Strachan T., Read A. P. (1999): Human Molecular Genetics. Garland Science.
- Stuart J. K., Myszka D. G., Joss L., Mitchell R. S., McDonald S. M., Xie Z., Takayama S., Reed J. C., Ely K. R. (1998): Characterization of interactions between the anti-apoptotic protein bag-1 and hsc70 molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 273, 22506-22514.
- Sundberg M., Savola S., Hienola A., Korhonen L., Lindholm D. (2006): Glucocorticoid hormones decrease proliferation of embryonic neural stem cells through ubiquitin-mediated degradation of cyclin D1. *Neurobiology Disease* 26 (20), 5402-5410.
- Takayama S., Sato T., Krajewski S., Kochel K., Irie S., Millan J. A., Reed J. C. (1995): Cloning and functional analysis of bag-1: a novel bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80 (2), 279-284.
- Takayama S., Bimston D. N., Matsuzawa S., Freeman B. C., Aime-Sempe C., Xie Z., Morimoto R. I., Reed J. C. (1997): Bag-1 modulates the chaperone activity of hsp70/hsc70. *EMBO J.* 16 (16), 4887-4896.
- Takayama S., Krajewski S., Krajewska M., Kitada s., Zapata JM., Kochel K., Knee D., Scudiero D., Tudor G., Miller GJ, Miyashita T., Yamada M., Reed JC. (1998): Expression and location of hsp70/hsc-binding anti-apoptotic protein bag-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res.* 58 (14), 3116-3131.
- Takayama S., Xie Z., Reed J. C. (1999): An evolutionarily conserved family of hsp70/hsc70 molecular chaperone regulators. *J. Biol. Chem.* 274 (2), 781-786.

- Takayama S., Reed J. C. (2001): Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat. Cell Biol.* 3 (10), 237-241.
- Tan C. K., Yan J., Ananth C., Kaur C. (2002): Dexamethasone induces dendritic alteration but not apoptosis in the neurons of the hippocampus in postnatal rats. *Neuroscience Letters* 326, 206-210.
- Tanapat P., Hastings N. B., Reeves A. J., Gould E. (1999): Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J. Neurosci.* 19 (14), 5792-5801.
- Temple S. (2001): The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112-117.
- Teti A. (1992): Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2, 83-87.
- Thompson E. B. (1999): Mechanisms of T-cell Apoptosis induced by glucocorticoids. *Trends Endocrinol. Metab.* 10 (9), 353-358.
- Terada K., Mori M. (2000): Human DnaJ homologs dj2 and dj3, and bag-1 are positive cochaperones of hsc70. *J. Biol. Chem.* 275 (32), 24728-24734.
- Townsend P. A., Cutress R. I., Sharp A., Brimmell M., Packham G. (2003): Bag.1 prevents stress-induced long-term growth inhibition in breast cancer cells via a chaperone-dependent pathway. *Cancer Res.* 63, 4150-4157.
- Townsend P. A., Stephanou A., Packham G., Latchman D. S. (2005): Bag-1: a multifunctional pro-survival molecule. *Intern. J. Biochem. & Cell Biol.* 37, 251-259.
- Uno H., Eisele S., Sakai A., Shelton S., Baker E., DeJesus O., Holden J. (1994): Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm. Behav.* 28 (4), 336-348.
- Utto M., Vasterling J. J., Brailey K., Sutker P. B. (1993): Memory and attention in combat related posttraumatic-stress-disorder (PTSD). *Psychopathol. Behav. Assess.* 15, 43-52.
- van Steensel B., Brink M., van der Meulen K., van Binnendijk EP., Wansink DG., de Jong L., de Kloet ER., van Driel R. (1995): *J. Cell. Sci.* 108 (9), 3003-3011.
- Varshavsky A. (1997): The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* 22 (10), 383-387.
- Vila M., Przedborski S. (2003): Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 1-11.
- Wallace A. D., Cidlowski J. A. (2001): Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 276 (46), 42714-42721.
- Wang HG., Takayama S., Rapp U. R., reed J. C. (1996): Bcl-2 interacting protein, bag-1, binds to and activates the kinase raf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (14), 7063-8.

- Wang H. G., Reed J. C. (1998): Bcl-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis. *Biofactors* 8, 13-16.
- Wang X. (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15 (22), 2922-2933.
- Wehner R., Gehring W. (1995): Zoologie. *Thieme*, Stuttgart.
- Widén C., Zilliacus J., Gustafsson J.A., Wikstrom A.C. (2000): Glucocorticoid receptor interaction with 14-3-3 and Raf-1 a proposed mechanism for cross-talk of two signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 275 (59), 39296-39301.
- Wiese S., Metzger F., Holtmann B., Sendtner M. (1999 a): The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *European J. Neurosci.* 11, 1668-1676.
- Wiese S., Digby M. R., Gunnarsen J. M., Gotz R., Pei G., Holtmann B., Lowenthal J., Sendtner M. (1999 b): The anti-apoptotic protein ITA is essential for NGF-mediated survival of embryonic chick neurons. *Nat. Neurosci.* 2 (11), 978-983.
- Wiese S., Pei G., Karch C., Troppmair J., Holtmann B., Rapp U. R., Sendtner M. (2001): Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat. Neurosci.* 4 (2), 137-142.
- Wong V., Glass D.J., Arriaga R., Yancopoulos G. D., Lindsay R.M., Conn G. (1997): Hepatocyte growth factor promotes motor neuron survival and synergizes with ciliary neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* 272 (8), 5187-5191.
- Wong E. Y. H., Herbert J. (2006): Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience* 137, 83-92.
- Wróbel A., Nowak G., Ossowska G., Danilczuk Z., Zebrowska-Lupina I., Wielosz M. (2004): Effect of chronic treatment with dexamethasone on brain dopamine receptors in mice. *Pol. J. Pharmacol.* 56, 399-405.
- Yang X., Hao Y., Rerency A., Tang S. C., Pater A. (1999): Overexpression of anti-apoptotic gene bag-1 in human cervical cancer. *Exp. Cell Res.* 247, 200-207.
- Yang X., Hao Y., Ding Z., Pater A. (2000): BAG-1 promotes apoptosis induced by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in human cervical carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 256 (2), 491-499.
- Yawata A., Adachi M., Okuda H., Naishiro Y., Takamura T., Hareyama M., Takayama S., Reed J. C., Imai K. (1998): Prolonged cell survival enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells. *Oncogene* 16 (20), 2681-2686.
- Young J. C., Hartl F. U. (2000): Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J.* 19 (21), 5930-5940.

Yuan J., Yankner B. A. (2000): Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407 (6805), 802-809.

Zeiner M, Gehring U. (1995): A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 11465-11469.

Zeiner M., Gebauer M., Gehring U. (1997): Mammalian protein Rap46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins. *EMBO J.* 16 (18), 5483-5490.

Zeiner M., Niyaz Y., Gehring U. (1999): The hsp70-associating protein Hap46 binds to DNA and stimulates transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10194-10199.

Zhou F. C., Azmitia E. C. (1988): Laminin facilitates and guides fiber growth of transplanted neurons in adult brain. *J. Chem. Neuroanat.* 1(3), 133-146.



## 6. Anhang

### Erklärungen

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegt habe.

Würzburg,

Hiermit versichere ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Würzburg,

**Persönliche Daten**

Name: Karin Frebel  
Anschrift: Habichtstr. 5, 48329 Havixbeck  
Geburtsdatum/-ort: 11.01.1977 in Münster, Westfalen  
Familienstand: ledig  
Name des Vaters: Dr. Manfred Frebel, verstorben 1984  
Name der Mutter: Hedwig Frebel, geb. Ifland

**Schulbildung:**

1983-1987: Grundschule Havixbeck, Westfalen  
1987-1996: Marienschule Münster, Bischöfl. Mädchengymnasium

**Berufliche Ausbildung**

08/1996-07/1997 Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin an der Rheinischen Akademie e. V., Köln

**Studium:**

10/1997-09/1999 Studium der Geophysik an der Westfälischen Wilhelms-Universität (Münster, Westfalen)  
10/1998-09/2003 Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität (Münster, Westfalen); Abschluss: Diplom  
12/2002-09/2003 Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Münster:

**Promotionsstudiengang:**

04/2004-02/2006 Promotionsstudiengang an der Universität Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
10/2003-12/2006 Doktorarbeit am Institut für klinische Neurobiologie, Würzburg

**Tätigkeiten:**

03/2002-09/2003 Studentische Hilfskraft am Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Münster, bei Prof. Dr. A. Püschel  
10/2003-12/2006 Wissenschaftliche Assistentin am Institut für klinische Neurobiologie, Würzburg, bei Prof. Dr. M. Sendtner

## Publikationen

Karin Frebel<sup>\*</sup>, Stefan Wiese<sup>\*</sup>, Natalja Funk, Michael Sendtner, (<sup>\*</sup> equal contribution):  
Differential Modulation of Neurite Growth by the S- and the L-Form of Bag1, a Co-  
Chaperone of Hsp70. *Neurodegenerative Diseases*. (akzeptiert im Januar 2007)

Karin Frebel, Stefan Wiese (2006): Signalling molecules essential for neuronal  
survival and differentiation. *Biochemical Society Transactions* 36 (6), 1287-1290.

## **Ich möchte mich bedanken bei...**

**Professor Dr. Stefan Wiese** für die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu können. Außerdem möchte ich mich bei ihm bedanken für anregende und kritische Diskussionen, sein Vertrauen in meine Arbeit und die Möglichkeit der kreativen Freiheit während meiner Arbeit,

**Professor Dr. Erich Buchner** für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachters,

**Professor Dr. Michael Sendtner** für die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu können und die Ratschläge und Diskussionen während meiner Arbeit,

**all meinen Laborkollegen der AG Sendtner** für das angenehme Arbeitsklima, besonders Dirk Pühringer für die vielen „wilden“ Diskussionen und die angenehme Zusammenarbeit sowie Catia Andreassi, Thomas Herrmann und Sabrina Loos für das angenehme und humorvolle Zusammenarbeiten auf engstem Raum, die leckeren Naschereien und die vielen Tipps und Tricks zum Meistern aller Laborarbeiten,

**meiner Mutter und meinen Geschwistern Dirk, Heike und Thomas** für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung nicht nur während dieser Arbeit, es gibt kein größeres und wertvolleres Geschenk als sie immer an meiner Seite zu wissen,

**meinen Freundinnen Barbara, Bianca, Eva und Sabine** für ihre über 20jährige Freundschaft sowie für ihre Unterstützung während meiner Arbeit in Würzburg durch stundenlange Telefonate, seitenlange Emails, kleine Care-Pakete und Besuche. Ohne sie hätte ich es niemals so weit geschafft. Babs und Bibi möchte ich auch noch für die Korrekturen meiner Arbeit danken. So mancher „Akt“ und „Todes-Ligand“ hat zwar für viel belustigende Verwirrung gesorgt, aber sie haben es dennoch sehr gut hinbekommen (ja, ich habe es gelernt, es heisst „hinbekommen“ statt „hingekriegt“).

**Besonders bedanken möchte ich mich bei zwei Menschen. Sie waren meine Motivation diese Arbeit zu schreiben:**

**Meinem Freund Metin** möchte ich danken für seine Liebe und Unterstützung und dafür, dass er mit mir ohne zu zögern nach Würzburg gegangen ist. Besonders danken möchte ich ihm außerdem, dass er in den letzten zwei Jahren nie aufgehört hat, mir immer wieder zu beweisen, dass das Leben doch noch einen Sinn macht.

**Meiner Schwester Kirsten** möchte ich danken für jede Minute, jede Stunde, jeden Tag, den ich mit ihr erleben durfte, nicht nur während meiner Arbeit in Würzburg, und noch für so vieles mehr. Ich danke ihr, dass sie auch jetzt noch für mich da ist und ihre kleine Schwester niemals aus den Augen lässt.