

Aus der Medizinischen Klinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

## REGULATION UND EXPRESSION VON P450SCC IM NERVENSYSTEM

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Fabian Hammer  
aus Marktheidenfeld

Würzburg, Februar 2003

Referent: Professor Dr. med. B. Allolio

Koreferent: Professor Dr. med K. P. Lesch

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12.2003

Der Promovend ist Arzt

Für Mechtild und Heinz

# Inhalt

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Synthese von Steroidhormonen.....  | 1         |
| 1.2      | Was sind <i>Neuro-Steroide</i> ? .....                                     | 3         |
| 1.3      | Wie wirken <i>Neurosteroide</i> ? .....                                    | 4         |
| 1.3.1    | GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-vermittelte neurosteroidale Wirkungen.....     | 6         |
| 1.3.2    | Neurosteroidale Wirkungen auf Lernen und Gedächtnis .....                  | 8         |
| 1.3.3    | Neurosteroide und Neuroprotektion .....                                    | 9         |
| 1.3.4    | Neurosteroide in der neokortikalen Organisation des ZNS.....               | 9         |
| 1.3.5    | Die Rolle von Neurosteroiden in der Myelinisierung .....                   | 10        |
| 1.4      | Das „ <i>Cytochrom P450-side chain cleavage</i> “-Enzym .....              | 11        |
| 1.4.1    | Biochemische Eigenschaften von P450sc.....                                 | 11        |
| 1.4.2    | Expressionsmuster von P450sc .....   | 12        |
| 1.4.2.1  | ... in Glia-Zellen und Neuronen.....                                       | 12        |
| 1.4.2.2  | ... im adulten Gehirn .....  | 13        |
| 1.4.2.3  | ... im foetalen Gehirn.....  | 14        |
| 1.4.3    | Ko-Enzyme von P450sc .....   | 15        |
| 1.4.4    | Expression der Ko-Enzyme im Nervensystem.....                              | 15        |
| 1.4.5    | Regulation der Steroid-Biosynthese .....                                   | 16        |
| 1.4.5.1  | Regulation von P450sc in den Gonaden und der Nebenniere .....              | 17        |
| 1.4.5.2  | ... in glialen C6-Zellen.....  | 19        |
| 1.5      | Fragestellung dieser Arbeit .....  | 21        |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>  | <b>22</b> |
| 2.1      | Zellkultur.....  | 22        |
| 2.2      | Extraktion nukleärer Proteine aus kultivierten Zellen.....                 | 22        |
| 2.3      | Die elektrophoretische Gelretentionsanalyse (EMSA).....                    | 23        |
| 2.3.1    | Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde mit <sup>32</sup> P..... | 24        |
| 2.3.1.1  | Anlagerung zweier komplementärer DNA-Einzelstränge.....                    | 24        |
| 2.3.1.2  | Radioaktive Markierung von DNA durch T4-DNA-Kinase .....                   | 24        |
| 2.3.1.3  | Natriumacetat/Ethanol-Präzipitation von DNA.....                           | 24        |
| 2.3.1.4  | Protein:DNA-Bindungsreaktion .....   | 25        |
| 2.3.1.5  | Elektrophoretische Auftrennung und Autoradiographie .....                  | 25        |
| 2.4      | Der DNase I-Footprinting Assay .....                                       | 26        |
| 2.4.1    | Herstellung eines markierten P450sc-Promoterfragments .....                | 27        |
| 2.4.1.1  | Radioaktive Markierung des 5'- und 3'-Primers.....                         | 27        |
| 2.4.1.2  | Phenol/Chloroformextraktion von DNA .....                                  | 27        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 2.4.1.3     | PCR-Amplifikation des -270/-90 P450scc-Promoterfragments .....      | 28        |
| 2.4.1.4     | Herstellung eines DNA-Markers nach Maxim & Gilbert .....            | 28        |
| 2.4.1.5     | Protein:DNA-Bindungsreaktion .....                                  | 29        |
| 2.4.1.6     | Elektrophoretische Auftrennung.....                                 | 29        |
| <b>2.5</b>  | <b>Ammoniumsulfat-Präzipitation von Proteinen .....</b>             | <b>30</b> |
| <b>2.6</b>  | <b>Säulen-Chromatographische Auftrennung von Proteinen .....</b>    | <b>31</b> |
| <b>2.7</b>  | <b>Auftrennung und Detektion von Proteinen.....</b>                 | <b>32</b> |
| 2.7.1       | Polyakrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....                         | 32        |
| 2.7.2       | Western-Blot.....   | 33        |
| 2.7.2.1     | Detektion von Protein durch immunologische Techniken .....          | 34        |
| 2.7.2.2     | Blotting-Technik zur Aminosäuren-Sequenzanalyse .....               | 35        |
| 2.7.3       | Detektion von Proteinen durch Silberimprägnierung.....              | 36        |
| <b>2.8</b>  | <b>Konstruktion von Luciferase-Reporter-Plasmiden .....</b>         | <b>36</b> |
| 2.8.1       | Subklonierung von Promoterabschnitten des P450scc-Gens .....        | 37        |
| 2.8.1.1     | Subklonierung einer 190 bp Promoterdeletion des Cyp11a1-Gens .....  | 37        |
| 2.8.1.2     | Subklonierung von kurzen Elementen des P450scc-Promoters .....      | 38        |
| 2.8.2       | Transformation .....  | 40        |
| 2.8.3       | Mini-Preparation von DNA aus bakteriellen Kulturen.....             | 41        |
| 2.8.4       | Maxi-Preparation von DNA aus bakteriellen Kulturen.....             | 41        |
| 2.8.5       | Sequenzierung von rekombinierter DNA .....                          | 41        |
| <b>2.9</b>  | <b>Transiente Transfektion von kultivierten C6-Zellen .....</b>     | <b>42</b> |
| <b>2.10</b> | <b>Luciferase-Assay .....</b>                                       | <b>43</b> |
| <b>2.11</b> | <b>Immunhistochemie .....</b>                                       | <b>44</b> |
| 2.11.1      | Biotinylierung von Antikörpern .....                                | 44        |
| 2.11.2      | Sektionierung und Fixierung des Gewebes .....                       | 44        |
| 2.11.3      | Immunfärbung mit P450scc-Antikörper .....                           | 45        |
| 2.11.3.1    | ... und Antikörpern gegen die beiden <i>Ku</i> -Untereinheiten..... | 45        |
| 2.11.3.2    | ... und Antikörpern gegen Sp-Proteine .....                         | 45        |
| <b>3</b>    | <b>ERGEBNISSE.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Die -130/-94 Region des P450scc-Promoters .....</b>              | <b>46</b> |
| 3.1.1       | Biochemische Aufreinigung des DNA-bindenden C6-Proteins.....        | 47        |
| 3.1.1.1     | Ammoniumsulfat-Präzipitation .....                                  | 48        |
| 3.1.1.2     | Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....                   | 48        |
| 3.1.1.3     | Der <i>Ku</i> -Komplex bindet an die -130/-94 Region .....          | 51        |
| 3.1.1.4     | Transkriptionelle Aktivierung von CYP11a1 durch <i>Ku</i> .....     | 52        |
| 3.1.1.5     | Ko-Lokalisation von P450scc und <i>Ku</i> im Nervensystem.....      | 54        |
| 3.1.1.6     | Zusätzliche C6-Proteine binden an die -130/-94 Region.....          | 56        |
| 3.1.1.7     | Mitglieder der Sp-Familie binden an die -130/-94 Region.....        | 56        |
| 3.1.1.8     | Ko-Lokalisation von Sp-Proteinen und P450scc.....                   | 57        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>3.2</b> | <b>Die -230/-130 Region des P450<sub>scc</sub>-Promoters .....</b>   | <b>60</b> |
| 3.2.1      | Analyse der -230/-130 Region mit DNase I <i>Footprinting</i> .....   | 60        |
| 3.2.2      | Gelretentionsanalyse der geschützten Bereiche .....                  | 62        |
| 3.2.2.1    | Nukleäre Proteine der C6-Zellen binden an die -220/-200 Region ..... | 62        |
| 3.2.2.2    | Nukleäre Proteine der C6-Zellen binden an die -183/-165 Region ..... | 63        |
| 3.2.3      | Die -200/-181 und -183/-165 Regionen sind funktionell inaktiv .....  | 64        |
| 3.2.4      | Die Region zwischen -230/-190 ist transkriptionell inaktiv .....     | 65        |
| <b>4</b>   | <b>DISKUSSION .....</b>  | <b>67</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Charakterisierung der -130/-94 Region .....</b>                   | <b>67</b> |
| 4.1.1      | Der <i>Ku</i> -Komplex .....   | 68        |
| 4.1.2      | Die Familie der Sp-Proteine .....                                    | 72        |
| 4.1.2.1    | Sp1 .....  | 73        |
| 4.1.2.2    | Sp4 .....  | 74        |
| <b>4.2</b> | <b>Charakterisierung der -230/-151 Region .....</b>                  | <b>75</b> |
| <b>5</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>77</b> |
| <b>6</b>   | <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>   | <b>79</b> |
| <b>7</b>   | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                   | <b>92</b> |
| <b>8</b>   | <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                   | <b>95</b> |
| <b>9</b>   | <b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>                                     | <b>96</b> |

**DANKSAGUNG**

**CURRICULUM VITAE**

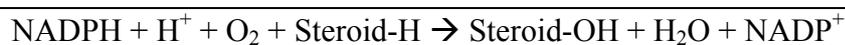
# 1 Einleitung

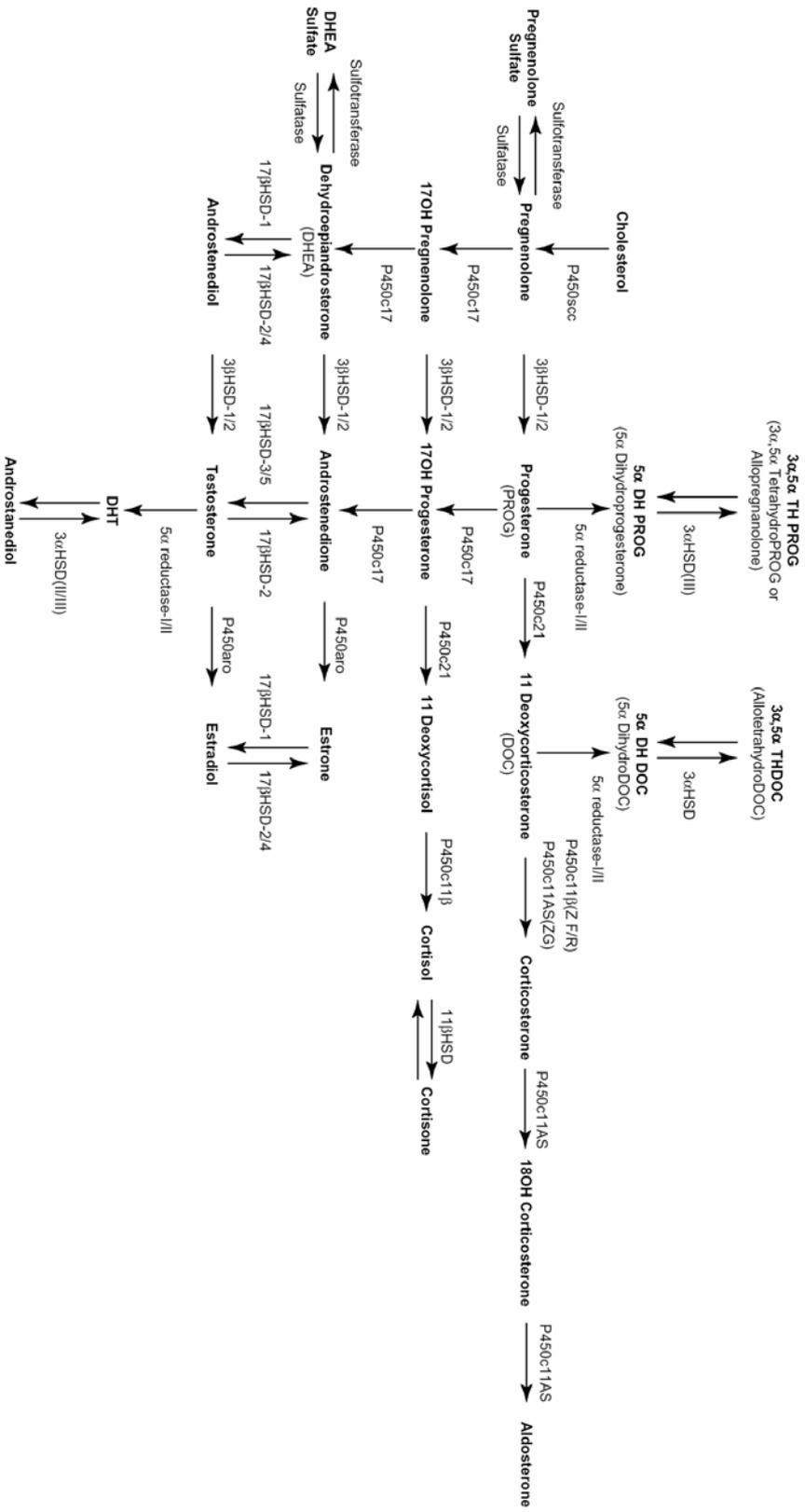
## 1.1 Synthese von Steroidhormonen

Das Vorläufersteroid, von dem alle Steroidhormone abstammen, ist das Cholesterin. Steroidhormon-produzierende Zellen werden durch Lipoproteine geringer (*low density lipoprotein*, LDL) und hoher (*high density lipoprotein*, HDL) Dichte über das Plasma mit Cholesterin versorgt (Brown et al., 1979). Darüber hinaus kann ein Teil des Cholesterins direkt in den steroid-produzierenden Zellen aus Azetat synthetisiert werden. Intrazellulär wird Cholesterin als Cholesterinester in Form kleiner Lipidtröpfchen gespeichert. Trophische Hormone wie beispielsweise ACTH können das gespeicherte Cholesterin über eine Aktivierung der Cholesterinesterase aus den Speichern freisetzen, wodurch es zu einem raschen intrazellulären Anstieg an freiem Cholesterin kommt.

Die Biosynthese der unterschiedlichen Steroidhormone wird durch verschiedene Klassen von Enzymen katalysiert. Hierzu gehören Hydroxylasen (Desmolasen), Oxidoreduktasen (Dehydrogenasen), Sulfotransferasen und Sulfohydrolasen (Abbildung 1). Auf zellulärer Ebene sind diese Enzyme in verschiedenen zellulären Kompartimenten wie den Mitochondrien, Mikrosomen und dem Zytoplasma lokalisiert. Biochemisch können diese Enzyme in zwei Gruppen unterteilt werden. Hierbei handelt es sich zum einen um die Gruppe der Cytochrom-P450-Enzyme, die durch Komplexierung mit Kohlenmonoxid eine maximale Absorption bei 450 nm aufweisen, und zum anderen um die Gruppe der Nicht-Cytochrom-P450-Enzyme.

Alle P450-Cytochrome sind Monooxygenasen, die eine zentrale Hämgruppe besitzen und atmosphärischen Sauerstoff mit Elektronen von NADPH nach folgender Gleichung reduzieren:





**Abbildung 1** Diagramm der Neurosteroidogenese

Die Namen der jeweiligen Enzyme stehen bei der entsprechenden Reaktion: P450sc vermittelt 20α Hydroxylierung, 22 Hydroxylierung und Spaltung der c20,22 Bindung; 3β HSD vermittelt sowohl 3β Dehydrogenase- als auch Δ5-Δ4 Isomeraseaktivität; P450c11β vermittelt c11 Hydroxylierung; P450c11AS vermittelt c11,19 Hydroxylierung und c18 Oxidation. Z F/R and ZG beziehen sich auf die adrenale *Zona fasciculata/reticularis* oder *Zona glomerulosa*. P450c17 vermittelt c17 Hydroxylierung und Spaltung der c17,20 Bindung; P450c21 vermittelt c21 Hydroxylierung (Das Vorhandensein dieses Enzyms konnte bisher weder auf mRNA- noch auf Proteinebene detektiert werden.); 17β HSD vermittelt 17β Reduktion oder Oxidation durch verschiedene Isoformen. 11β HSD vermittelt 11β Reduktion oder Oxidation durch zwei verschiedene Isoformen; 3α bzw. 5αHSD vermitteln die Oxidation von c3 bzw. c5; P450aro vermittelt die Aromatisierung des A-Rings; Steroidsulfatasen und -sulfotransferasen vermitteln die Interkonversion zwischen sulfatierten und nicht sulfatierten Steroiden (Mellon and Griffin, 2002).

Die Elektronen des NADPH werden in dieser Reaktion durch spezielle Elektronentransportsysteme übertragen. Für die mitochondrialen Enzyme handelt es sich hierbei um Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase (Miller, 1988).

## 1.2 Was sind *Neuro-Steroide* ?

Alle Steroide, die im Nervensystem entweder *de novo* aus Cholesterin oder einem anderen frühen Steroid-Vorläufermolekül synthetisiert werden, werden als *Neuro-Steroide* bezeichnet (Baulieu, 1991; Baulieu und Robel, 1990). Als neuroaktive Steroide hingegen werden alle Steroidhormone bezeichnet, die eine direkte Wirkung auf das Nervensystem besitzen, aber nicht notwendigerweise dort synthetisiert werden (Paul und Purdy, 1992).

In den frühen achtziger Jahren machten Baulieu und Mitarbeiter die Beobachtung, dass bestimmte Steroide wie Pregnenolon, DHEA sowie ihre Lipid- bzw. Sulfatester im Gehirn von Ratten in höheren Konzentrationen vorliegen als im Plasma dieser Tiere. Auch nach Gonad- und Adrenalektomie war die Konzentration von DHEA im Gehirn im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert. Diese Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass die Steroidvorkommen im Gehirn auf *in situ*-Mechanismen dieses Organs zurückzuführen und zumindest zum Teil vollkommen unabhängig von den im Plasma zirkulierenden Steroiden aus den peripheren endokrinen Drüsen sind (Corpechot et al., 1981). Darüber hinaus unterliegen Pregnenolon und DHEA im Gehirn von Ratten einem zirkadianen Rhythmus, der unabhängig von den Plasmakonzentrationen ist, was die Fähigkeit des Nervensystems, Steroide nicht nur eigenständig, sondern auch in einer kontrollierten Art und Weise zu synthetisieren, weiter unterstreicht (Robel et al., 1986).

Durch immunhistochemische Techniken gelang es Le Goascogne und Mitarbeitern erstmals 1987, die Expression von P450<sub>scc</sub>, dem Schlüsselenzym der Steroidogenese, im Gehirn von Nagern nachzuweisen (Le Goascogne et al., 1987). Die Tatsache, dass sowohl gliale Mitochondrien als auch Primärkulturen glialer Zellen in der Lage sind, Cholesterin in Pregnenolon zu konvertieren, zeigte darüber hinaus, dass das P450<sub>scc</sub>-Enzym im Gehirn auch funktionell aktiv ist (Hu et al., 1987; Jung-Testas et al., 1989).

Diesen frühen Beobachtungen folgten detailliertere Untersuchungen zu sämtlichen an der klassischen Steroidogenese beteiligten Enzymen im zentralen und peripheren Nervensystem. Die Ergebnisse vieler Gruppen belegen nicht nur die Präsenz und biochemische Aktivität aller klassischen Enzyme der Steroidogenese, sondern zeigen darüber hinaus, dass im Nervensystem zusätzliche Enzyme an der Synthese von Neurosteroiden beteiligt sind. Ein Überblick über die wichtigsten Neurosteroiden und die an deren Synthese beteiligten Enzyme ist in Abbildung 1 dargestellt.

### 1.3 Wie wirken Neurosteroiden ?

Steroidhormone, die von den Nebennieren und Gonaden synthetisiert werden, erreichen ihre Zielorgane über den Blutstrom. Dieses Prinzip wird auch als klassische endokrine Hormonwirkung bezeichnet. Im Gegensatz hierzu wirken Steroide, die von Gliazellen und Neuronen *de novo* im Nervensystem synthetisiert werden, direkt in einer autokrinen und parakrinen Art und Weise am Ort ihres Entstehens. Durch diesen Wirkmechanismus können lokal deutlich höhere Konzentrationen erreicht werden als im Plasma.

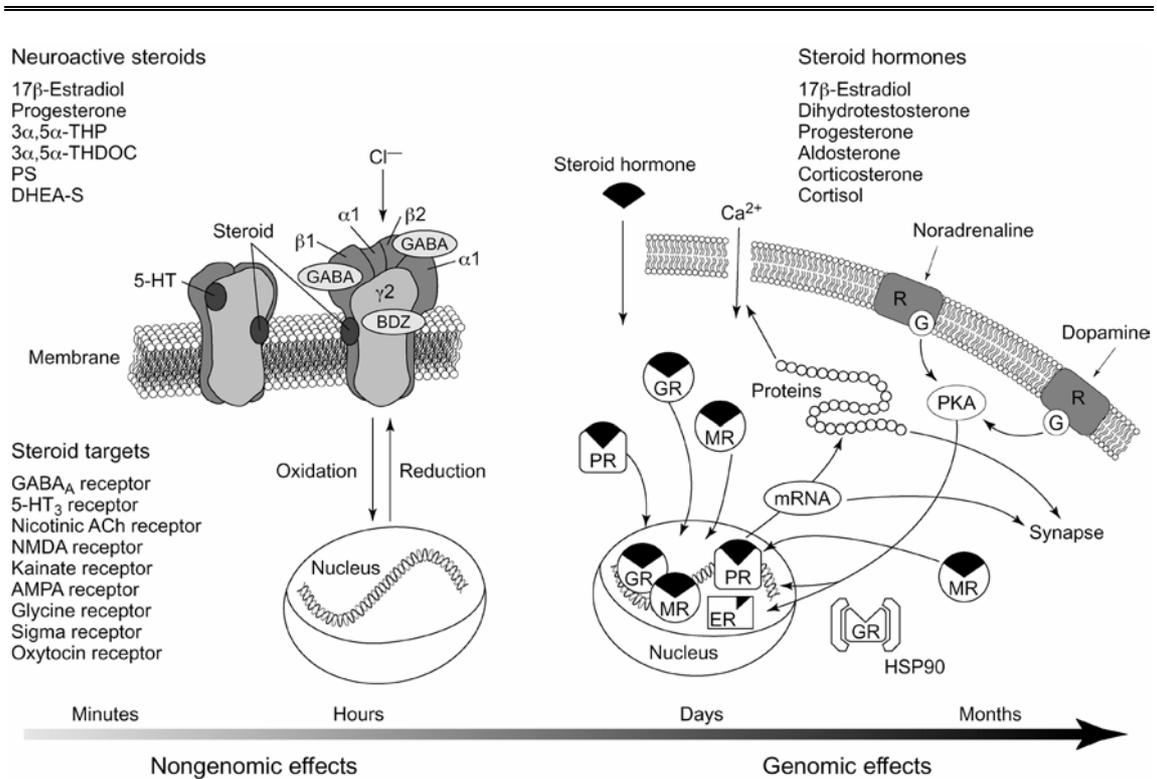
Ein weiterer bemerkenswerter Unterschied in der Wirkungsweise von Neurosteroiden gegenüber „klassischen“ Steroiden ist der Mechanismus, über den sie ihre Wirkung auf die Zielzelle entfalten. Die im Plasma zirkulierenden Steroide diffundieren typischerweise durch die Zellmembran der peripheren Zielzellen und binden dort im Zytoplasma nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an ihren entsprechenden Steroidhormonrezeptor (Abbildung 2). Nach Hormonbindung bilden sich Rezeptordimere, die dann in den Zellkern translozieren. Dort binden diese Steroidhormonrezeptordimere an DNA-Sequenzen, sogenannte *Hormon Response Elements*, die sich im Promoterbereich der entsprechenden Zielgene befinden. Über die Protein:DNA-Interaktion kommt es dann zu einer Aktivierung oder Repression der Transkription der Zielgene. Diesen Mechanismus bezeichnet man als genomisches Wirkprinzip von Steroidhormonen, da er sowohl Transkription als auch Translation beinhaltet und durch entsprechende Hemmsubstanzen wie Aktinomycin D und Zykloheximid blockiert werden kann. Die verschiedenen Steroidhormonrezeptoren bilden eine gut charakterisierte Rezeptor-Super-Familie, die die genomischen

Wirkungen der von den Nebennieren und Gonaden sezernierten Steroidhormone in den peripheren Zielzellen vermitteln (Beato, 1989; Fuller, 1991).

Ähnlich wie die „klassischen“ Steroide wirken auch Neurosteroide über genomische Effekte in Zellen des Nervensystems. Eine direkte Wirkung auf die Transkription von Zielgenen, vermittelt über die Bindung von Steroidhormonrezeptoren an den Promoterbereich dieser Gene, ist im Nervensystem jedoch eher die Ausnahme. Im Gegensatz zu diesen verzögerten genomischen Effekten vermitteln Neurosteroide in den meisten Fällen ihre Wirkung über neuartige, viel schneller ablaufende Mechanismen. Dieses Phänomen wurde erstmals 1941 von Hans Selye beschrieben. Er entdeckte, dass Progesteron und sein  $3\alpha$ -Derivat unmittelbar nach Applikation einen anästhetischen Effekt ausüben, der nur über einen nicht-genomischen Wirkungsmechanismus zu erklären war (Selye, 1941). Diese rapiden Effekte wurden zwischenzeitlich auch in vielen anderen Studien beschrieben und konnten direkten Interaktionen von neuroaktiven Steroiden mit membranständigen Rezeptoren zugeschrieben werden (Abbildung 2). Durch die Bindung eines Neurosteroids an membranständige Neurotransmitterrezeptoren kommt es zu einer Modulation dieses Rezeptors, die zu Veränderungen der Erregbarkeit des Neurons und der Freisetzung von Neurotransmittern führt. Diese Interaktionen konnten mittlerweile sowohl *in vitro* als auch *in vivo* insbesondere für den  $\gamma$ -Aminobuttersäurerezeptor (GABA) Typ A, den N-Methyl-Aspartat (NMDA) und den Sigma 1 ( $\sigma 1$ )-Rezeptor gezeigt werden. Darüber hinaus interagieren Neurosteroide aber auch mit Glyzin-aktivierten Chloridkanälen (Prince und Simmonds, 1992), neuronalen Acetylcholin-Rezeptoren (Valera et al., 1992) und spannungsabhängigen Calciumkanälen (French-Mullen et al., 1994).

Die Wirkungen von Neurosteroiden im zentralen Nervensystem (ZNS) sind äußerst vielfältig und umfassen sowohl anästhetische, anxiolytische und antiepileptische als auch neurotrophische und neuroprotektive Effekte. Außerdem scheinen sie einen wichtigen Einfluss auf das Verhalten und die Stimmung zu haben. Im peripheren Nervensystem (PNS) üben Neurosteroide wichtige Funktionen bei der Myelinisierung von Nerven aus. Obwohl einige dieser Wirkungen eindeutig einem der oben genannten Neurotransmitterrezeptoren bzw. klassischen Steroidhormonrezeptoren zugeordnet werden konnten, so sind doch die meisten neurosteroidalen Effekte komplexerer Natur und bisher nur unzureichend verstanden. Die nächsten Seiten geben einen kurzen

Überblick über die bisher identifizierten physiologischen und pharmakologischen Wirkungen von neuroaktiven Steroiden.



**Abbildung 2** Wirkungsweise von Steroidhormonen  
 Auf der linken Seite sind die Interaktionen von Steroiden mit membranständigen Rezeptoren am Beispiel des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors dargestellt, die auch als *rapid non genomic*-Effekte bezeichnet werden. Auf der rechten Seite wird schematisch die klassische Wirkungsweise von Steroiden durch Steroidhormonrezeptoren gezeigt (Rupprecht und Holsboer, 1999).

### 1.3.1 GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte neurosteroidale Wirkungen

Der  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptor A (GABA<sub>A</sub>-R) ist verantwortlich für die Vermittlung der schnellen inhibitorischen synaptischen Übertragungen im ZNS. Bei dem GABA<sub>A</sub>-R handelt es sich um einen Chloridionenkanal, der durch Bindung des Liganden  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) geöffnet werden kann, wodurch es zu Veränderungen des neuronalen Membranpotenzials kommt. Die Stärke dieses Ionenstroms kann sowohl durch kompetitive (Bicucullin) als auch durch allosterische (Benzodiazepine, Barbiturate) Wirkungsmechanismen moduliert werden. Bereits 1984 konnte gezeigt werden, dass ein synthetisches Steroid (Alphaxalon [5 $\alpha$ -Pregnan-3 $\alpha$ -ol-11,20-on]) in Gewebeschnitten des *Nucleus cuneatus* der Ratte die durch GABA

induzierte Hyperpolarisation der Zellmembran verstärken kann (Harrison und Simmonds, 1984). Zwischenzeitlich konnten auch für eine Reihe physiologisch vorkommender Steroide positive allosterische Wirkungen am GABA<sub>A</sub>-R nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um 5 $\alpha$ -Derivate des Progesterons (5 $\alpha$ -Dihydroprogesteron [5 $\alpha$ -DHP], 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -Tetrahydroprogesteron [3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP]) sowie um 5 $\alpha$ -Derivate des 11-Deoxycorticosterons, für die in nanomolaren Konzentrationen Benzodiazepin-equipotente Effekte gezeigt werden konnten (Gee, 1988; Majewska et al., 1986; Morrow et al., 1987; Turner et al., 1989). Die exakte Bindungsstelle dieser neuroaktiven Steroide ist bislang unbekannt, sie befindet sich jedoch im extrazellulären Teil des GABA<sub>A</sub>-R (Lambert et al., 1990) und ist verschieden von denen der Benzodiazepine (Gee, 1988; Turner et al., 1989). Im Tiermodell zeigen diese neuroaktiven Steroide nach systemischer Applikation anxiolytische, antikonvulsive und anästhetische Effekte, ähnlich denen anderer positiver GABA<sub>A</sub>-R-Modulatoren (Majewska, 1992). Diese Effekte scheinen spezifisch über den GABA<sub>A</sub>-R vermittelt zu sein, da sie durch Picrotoxin, einen inversen GABA<sub>A</sub>-R-Agonisten, verhindert werden können (Bitran et al., 1991; Brot et al., 1997; Rodgers und Johnson, 1998). Ähnlich wie bei Benzodiazepinen zeigen Tiere nach abruptem Absetzen einer chronischen Progesteron-Applikation typische Entzugserscheinungen wie erhöhte Angst (Gallo und Smith, 1993; Smith et al., 1998b) sowie eine Erniedrigung der Krampfschwelle (Moran und Smith, 1998; Smith et al., 1998a). Diese Entzugserscheinungen konnten durch zusätzliche Applikation von Indomethacin, einem Inhibitor der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, verhindert werden, was ein klarer Hinweis darauf ist, dass diese zentralen Effekte nicht direkt durch Progesteron, sondern durch 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP vermittelt werden (Gallo und Smith, 1993). Aber auch physiologischerweise finden sich im Gehirn von schwangeren Ratten sehr viel höhere Konzentrationen von 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP als bei nicht schwangeren Tieren (Concas et al., 1998). Dieses Paradigma des akuten Abfalls hoher Progesteronspiegel könnte daher auch bei Frauen, die an postpartaler Depression (PPD) oder dem prämenstruellen Syndrom (PMS) leiden, eine wichtige pathogenetische Rolle spielen. So kommt es bei Frauen kurz vor Einsetzen der Monatsblutung und nach der Entbindung zu einem steilen Abfall der Serum-Progesteronspiegel, die im Falle des PMS und der PPD mit psychischer

Unausgeglichenheit und Ängstlichkeit (Dennerstein et al., 1985), aber auch mit einer erniedrigten Krampfschwelle (Morrell, 1999) vergesellschaftet sind.

Des Weiteren finden sich bei psychiatrischen Patienten mit unipolarer Depression im Vergleich zu gesunden Probanden erniedrigte Spiegel von  $3\alpha,5\alpha$ -THP im Liquor, deren Anstieg nach Behandlung mit SSRI positiv mit einer Verbesserung der klinischen Symptomatik korreliert werden konnte (Uzunova et al., 1998), was für eine neurosteroidale Beteiligung bei der Pathogenese der Depression sprechen könnte.

### 1.3.2 Neurosteroidale Wirkungen auf Lernen und Gedächtnis

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Neurosteroidale sowohl Gedächtnis als auch Lernprozesse positiv wie negativ beeinflussen können. Diese Effekte werden durch Interaktionen der Neurosteroidale mit verschiedenen membranständigen Neurotransmitterrezeptoren wie dem  $GABA_A$ -, NMDA- und  $\sigma 1$ -Rezeptor vermittelt. Hierbei zeigen Verbindungen, die am  $GABA_A$ -R agonistisch wirken, wie z.B.  $3\alpha,5\alpha$ -THP, eher amnestische Wirkungen (Darnaudery et al., 1999; Johansson et al., 2002), Substanzen, die am NMDA- wie am  $\sigma 1$ -Rezeptor agonistisch wirken, wie z.B. DHEA und Pregnenolon sowie deren Sulfatester, zeigen hingegen eher das Gedächtnis sowie Lernvorgänge verbessernde Effekte. So kommt es in Tiermodellen sowohl nach systemischer als auch nach intrazerebraler Applikation von DHEA/S und PREG/S zu einer Steigerung der Lernfähigkeit (Flood et al., 1992; Flood et al., 1995; Isaacson et al., 1995; Vallee et al., 1997). Darüber hinaus zeigen diese Steroide in pharmakologischen Amnesiemodellen eine schützende Wirkung auf das Gedächtnis in Bezug auf zuvor Erlerntes (Mathis et al., 1996; Maurice et al., 1998; Meziane et al., 1996). Wo genau diese Steroide im ZNS ihre Wirkungen auf das Gedächtnis entfalten, ist bislang noch weitestgehend ungeklärt. Eine in diesem Zusammenhang wichtige Region scheinen die cholinergen Neurone des *Nucleus basalis magnocellularis* zu sein (Darnaudery et al., 1999; Mayo et al., 1993; Pallares et al., 1998).

Außer diesen „pharmakologischen“ Effekten von neuroaktiven Steroiden auf die Lernfähigkeit konnte für PREGS auch eine physiologische Bedeutung hinsichtlich des räumlichen Gedächtnisses von Ratten gezeigt werden. So konnte in einer Studie die

Konzentration von PREGS im Hippocampus gealterter Ratten positiv mit dem räumlichen Gedächtnis der Tiere korreliert werden, wobei Tiere mit höheren hippocampalen PREGS-Konzentrationen ein besseres, Tiere mit niedrigeren hippocampalen PREGS-Konzentrationen ein schlechteres räumliches Gedächtnis hatten. Sowohl durch intraperitoneale als auch durch intrahippocampale Applikation von PREGS war es möglich, vorübergehend das räumliche Gedächtnis der gealterten Ratten mit niedrigen endogenen PREGS-Konzentrationen zu verbessern, was die physiologische Bedeutung von PREGS im Bereich des Hippocampus für das räumliche Gedächtnis von Ratten unterstreicht (Vallee et al., 1997).

### **1.3.3 Neurosteroidे und Neuroprotektion**

Einige Neurosteroidе zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in verschiedenen Modellsystemen neuroprotektive Wirkungen. Für PROG konnte ein neuroprotektiver Effekt sowohl nach cerebraler Ischämie (Jiang et al., 1996) und Kontusion (Roof et al., 1996), als auch nach akuter traumatischer Rückenmarkverletzung (Thomas et al., 1999) gezeigt werden. Ein ähnlicher Effekt wird auch für DHEAS in einem Ischämiemodell des Rückenmarks gefunden (Lapchak et al., 2000).

Der genaue Wirkungsmechanismus ist für beide Steroide unbekannt, jedoch zeigt PROG in kultivierten Neuronen des Rückenmarks (Ogata et al., 1993) und DHEAS in kultivierten Neuronen des Hippocampus (Kimonides et al., 1998) einen schützenden Effekt vor der exzitatorischen Aminosäure Glutamat, einem möglichen Mediator der ischämischen neuronalen Degeneration (Simon et al., 1984).

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint ein therapeutischer Einsatz bei ischämischen Schlaganfällen sowie traumatischen Rückenmarksverletzungen des Menschen in Zukunft durchaus vielversprechend.

### **1.3.4 Neurosteroidе in der neokortikalen Organisation des ZNS**

Neben diesen Effekten auf Lernfähigkeit und Neuroprotektion scheinen neuroaktive Steroide auch neurotrophische Effekte auf Neurone zu haben und könnten während der ZNS-Entwicklung an der zytoarchitektonischen Organisation des Nervensystems beteiligt sein. In Zellkulturexperimenten mit neokortikalen Neuronen

konnte gezeigt werden, dass DHEA konzentrationsabhängig das axonale Wachstum und die Ausbildung von synaptischen Markern fördert, DHEAS hingegen das Wachstum und die Verzweigung der Dendriten induziert (Compagnone und Mellon, 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Effekt von DHEA, nicht aber der von DHEAS, durch den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor vermittelt wird und zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration führt. Dieser neurotrophische Effekt von DHEA *in vitro* könnte für die Führung thalamischer Axone während der Entwicklung *in vivo* von Bedeutung sein, da das Schlüsselenzym für die Synthese von DHEA, P450c17, in einer umschriebenen Region des Gehirns exprimiert wird, die für die Projektion corticothalamischer Axone wichtig ist (Compagnone et al., 1995b). Neben DHEA/DHEAS konnte auch für  $3\alpha,5\alpha$  THP ein neurotrophischer Effekt in Kulturen foetaler Neuronen des Hippocampus gezeigt werden (Brinton, 1994). Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass Neurosteroiden eine noch näher zu untersuchende Rolle bei der neocorticalen Organisation zu spielen scheinen.

### **1.3.5 Die Rolle von Neurosteroiden in der Myelinisierung**

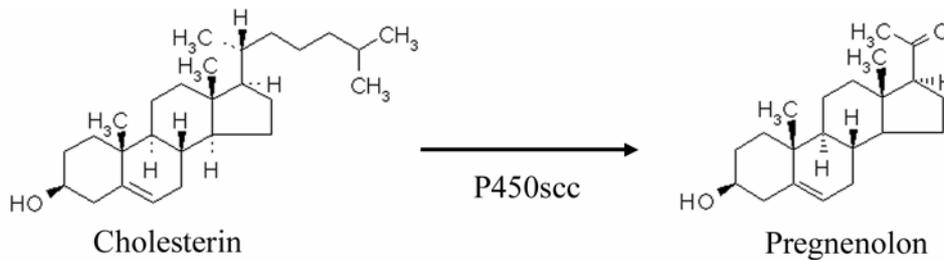
Bei Myelin handelt es sich um eine Ausstülpung der Zellmembran von Gliazellen, die die neuronalen Axone ummantelt und isoliert, was für die saltatorische Ausbreitung von Aktionspotentialen von funktioneller Bedeutung ist. In myelinisierten Nerven finden sich hohe Konzentrationen von PREG und PROG, die unabhängig von Nebennieren und Gonaden vor Ort in den Gliazellen synthetisiert werden können (Koenig et al., 1995) und eine wichtige Rolle bei der Myelinisierung spielen. In dem Paradigma des kälteschock-geschädigten Nervs konnte gezeigt werden, dass die Bindung von PROG an seinen klassischen Steroidhormonrezeptor (Progesteronrezeptor) für die Re-Myelinisierung des geschädigten Nervs von essentieller Bedeutung ist (Koenig et al., 1995). Durch zusätzliche Gabe von Progesteron konnte die Re-Myelinisierung sogar noch weiter verbessert werden, sodass ein therapeutischer Einsatz von Progesteron für die Reparatur traumatisch geschädigter Nerven in Zukunft durchaus denkbar ist.

## 1.4 Das „Cytochrom P450-*side chain cleavage*“-Enzym

Im Genom von Mensch, Maus und Ratte kodiert ein einziges Gen (CYP11a1) für das *side chain cleavage*-Enzym (Cytochrom P450scc) (Chung et al., 1986; Oonk et al., 1990). Das humane Gen ist auf Chromosom 15 lokalisiert und ca. 20 kb lang (Morohashi et al., 1987). Das Gen besteht aus neun Exonen, die eine mRNA von knapp 2 kb ergeben. Diese mRNA wiederum kodiert für ein 60,189 Da schweres Protein, das aus 521 Aminosäuren besteht. Ein N-terminales Signalpeptid von 39 Aminosäuren Länge dirigiert das Protein in die Mitochondrien der Zelle und wird anschließend abgespalten (Matteson et al., 1986). Innerhalb der Mitochondrien steht das Enzym in Kontakt mit der inneren Mitochondrienmembran (Seybert et al., 1979).

### 1.4.1 Biochemische Eigenschaften von P450scc

Das *side chain cleavage*-Enzym gehört der Cytochrom-P450-Fraktion der steroidmetabolisierenden Enzyme an (1.1). Das Enzym katalysiert die Konversion von Cholesterin zu Pregnenolon (Abbildung 3). Diese Reaktion stellt den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden und hormonell regulierten Schritt in der Synthese aller Steroidhormone dar (DuBois et al., 1981). Die biochemische Reaktion läuft in drei aufeinander folgenden chemischen Reaktionsschritten ab, die alle durch P450scc katalysiert werden: 20 $\alpha$ -Hydroxylierung, 22 $\alpha$ -Hydroxylierung sowie Spaltung der Bindung zwischen c20 und c22, wodurch aus Cholesterin, unter Abspaltung der Seitenkette (Isocaproensäure), Pregnenolon entsteht. Die Tatsache, dass diese 3 Reaktionsschritte von einem einzelnen Enzym mit nur einer einzigen katalytisch aktiven Domäne vollzogen werden (Shikita und Hall, 1973), wird für die geringe Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ : ~ 1 Mol Cholesterin / 1 Mol P450scc x Sekunde) des Enzyms verantwortlich gemacht (Morisaki et al., 1980).



**Abbildung 3** Biochemische Konversion von Cholesterin zu Pregnenolon  
 Dargestellt ist die von P450scc katalysierte Abspaltung der Cholesterin-Seitenkette, Isocapronsäure, wodurch aus Cholesterin Pregnenolon entsteht.

### 1.4.2 Expressionsmuster von P450scc ...

Neben den klassischen steroidhormonproduzierenden Geweben wie den Nebennieren, Hoden bzw. Ovarien lassen sich P450scc-mRNA und -Protein auch in der Placenta (Durkee et al., 1992), im Pankreas (Morales et al., 1999), dem embryonischen Verdauungstrakt und der Haut (Keeney et al., 1995), in der embryonischen Niere, dem Thymus und Nasenepithel (Compagnone et al., 1995a) sowie in Strukturen des zentralen und peripheren Nervensystems nachweisen (Mellon und Deschepper, 1993). In diesen Geweben finden sich jedoch im Vergleich zu den Nebennieren und Gonaden deutlich geringere Mengen von P450scc-mRNA und -Protein, die sich durch Techniken wie den *RNAse-Protection-Assay* oder die *in situ*-Hybridisierung nicht nachweisen lassen. Aus diesem Grund gelingt der Nachweis von P450scc in diesen Geweben nur mit äußerst sensitiven Methoden wie der RT-PCR oder durch immunhistochemische Techniken.

#### 1.4.2.1 ... in Glia-Zellen und Neuronen

Im Nervensystem von Nagern finden sich P450scc-Expression und biochemische Aktivität hauptsächlich in Glia-Zellen. Dies konnte erstmals an Gehirnen von Ratten durch immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen P450scc gezeigt werden, mit dem sich insbesondere die weiße Substanz anfärbte (Le Goascogne et al., 1987). Dass diese Immunreaktivität gegen P450scc auch einem funktionell aktiven Enzym entsprach, konnte anschließend an isolierten Mitochondrien aus Oligodendrozyten, dem Hauptbestandteil der weißen Substanz, gezeigt werden (Hu et

al., 1987). Aber auch in anderen Zellen glialen Ursprungs wie Typ I Astrozyten (Mellon und Deschepper, 1993), gemischten Glia-Zellkulturen (Jung-Testas et al., 1989), Schwannschen Zellen (Koenig et al., 1995) sowie C6-Zellen (Papadopoulos et al., 1992) findet sich sowohl P450scc-Protein als auch enzymatische Aktivität.

Außer in diesen Zellen glialen Ursprungs konnte P450scc aber auch durch RT-PCR und/oder Immunhistochemie in neuronalen Zellen wie den peripheren sensorischen Neuronen von Mäuseembryonen (Compagnone et al., 1995a), dem menschlichen *N. ischiadicus* (Morfin et al., 1992), in Neuronen der Retina von Ratten (Guarneri et al., 1994) und in ausdifferenzierten Purkinje Zellen des Kleinhirns (Ukena et al., 1998) nachgewiesen werden. An isolierten Neuronen konnte gezeigt werden, dass es sich auch bei dem neuronal exprimierten P450scc-Enzym um eine aktive Form handelt. Eine quantitative Analyse von P450scc mRNA und biochemischer Aktivität zeigt jedoch, dass Oligodendrozyten nicht nur größere Mengen von P450scc-mRNA besitzen, sondern im Vergleich zu Astrozyten bzw. Neuronen erwartungsgemäß auch eine drei- bzw. achtfach höhere enzymatische Aktivität besitzen (Zwain und Yen, 1999).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im zentralen Nervensystem neben Zellen neuronalen vor allem Zellen glialen Ursprungs P450scc exprimieren und die Fähigkeit besitzen, Cholesterin in Pregnenolon umzuwandeln.

### 1.4.2.2 ... im adulten Gehirn

Steroid-synthetisierende Enzyme wie P450scc werden nicht nur im Gehirn von Säugetieren wie Ratten (Jung-Testas et al., 1989; Le Goascogne et al., 1987), Mäusen (Compagnone et al., 1995a), Schafen (Petraatos et al., 2000) und Menschen (Watzka et al., 1999), sondern auch in den Gehirnen von Wachteln (Usui et al., 1995) und Amphibien (Takase et al., 1999) gefunden.

Die meisten Daten zu der Expression von P450scc im Nervensystem kommen von Untersuchungen an Ratten. Hier gibt es allerdings widersprüchliche Daten über die Verteilung von P450scc-mRNA im adulten Gehirn. Mittels RT-PCR und anschließendem *Southern Blotting* fanden Mellon und Deschepper P450scc-mRNA vor allem im Cortex und dem Bulbus olfactorius, weniger stark in den Amygdala, dem

Hippocampus und dem Mittelhirn. Ein Nachweis von P450scc-mRNA im Kleinhirn und Cerebellum gelang nicht (Mellon und Deschepper, 1993). Mit den gleichen Methoden, fanden jedoch andere Gruppen keinen offensichtlichen Unterschied von P450scc-mRNA im Bereich von Cortex, Zwischenhirn, Kleinhirn und Mittelhirn, was für eine ubiquitäre Expression von P450scc im adulten Gehirn der Ratte spräche (Kohchi et al., 1998; Sanne und Krueger, 1995; Stromstedt und Waterman, 1995).

An Gehirnen verstorbener Menschen fanden sich interessanterweise sowohl geschlechts- als auch altersabhängige Unterschiede in der Menge von P450scc-mRNA. Im Temporallappen zeigte sich ein altersabhängiger Anstieg von P450scc-mRNA, der mit der Pubertät den Level Erwachsener erreicht. Bei Frauen finden sich im Vergleich zu Männern erhöhte Mengen P450scc-mRNA im Bereich des Frontal- und Temporallappens. Angemerkt sei, dass das Gehirn nur ca. 1/200 der P450scc-mRNA-Menge der Nebennieren besitzt (Watzka et al., 1999).

### 1.4.2.3 ... im foetalen Gehirn

Während der Embryogenese von Mäusen und Ratten kommt es schon sehr frühzeitig zur Expression von P450scc im Nervensystem. Bei Mäusen lässt sich zum Zeitpunkt E 9.5 (E 10.5 bei Ratten) erstmals die Expression von P450scc mittels immunhistochemischer Methoden nachweisen. Zu diesem Zeitpunkt findet man Zellen mit Immunreaktivität gegen P450scc insbesondere im Bereich des frühen Neuralrohrs und der Neuralleisten. Auch zu späteren Zeitpunkten der Embryogenese wird P450scc insbesondere in Zellen der Neuralleiste bzw. in Strukturen, die ursprünglich den Neuralleisten entstammen, exprimiert. Hierzu zählen Neurone der Retina, des Neuroektoderms, des *Ganglion trigeminale* und der Spinalganglien sowie gliale Zellen des zentralen Nervensystems (Compagnone et al., 1995a). Darüber hinaus findet sich P450scc-Expression auch in Zellen, die nicht den Neuralleisten entstammen. Diese Zellen exprimieren P450scc jedoch erst zu einem späteren Stadium der Embryogenese. Hierzu zählen Motoneurone, Zellen im Bereich der Öffnung der Rathke-Tasche (Compagnone et al., 1995a), die Purkinje-Zellen des Kleinhirns (Ukena et al., 1998), Oligodendrozyten (Hu et al., 1987) und Astrozyten (Mellon und Deschepper, 1993).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es noch vor der Organogenese der Nebennieren oder Gonaden zu einer Expression von P450<sub>sc</sub> im Bereich des Neuralrohrs und der Neuralleisten kommt, was auf eine wichtige Funktion von Steroiden während der Entwicklung des Nervensystems schließen lässt. Zu späteren Zeitpunkten in der Embryogenese sowie bei erwachsenen Tieren findet sich P450<sub>sc</sub>-Expression in vielen unterschiedlichen Zelltypen sowohl des peripheren als auch des zentralen Nervensystems.

### **1.4.3 Ko-Enzyme von P450<sub>sc</sub>**

Im mitochondrialen Elektronentransportsystem fungiert P450<sub>sc</sub> als terminale Oxidase in einer Kette von Enzymen. Zunächst kommt es zu einer Übertragung von Elektronen von NADPH auf Adrenodoxin-Reduktase. Bei diesem Enzym handelt es sich um ein Flavoprotein, das locker mit der inneren mitochondrialen Membran verbunden ist (Kimura und Suzuki, 1967). Danach kommt es zu einer Übertragung der Elektronen von Adrenodoxin-Reduktase auf Adrenodoxin, das sich innerhalb der Mitochondrienmatrix in Lösung befindet (Hanukoglu et al., 1990). Anschließend werden die Elektronen von Adrenodoxin auf P450<sub>sc</sub> übertragen. Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase, die zuerst in den Nebennieren entdeckt wurden, werden auch als Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase bezeichnet, da es sich bei den beiden Proteinen um ubiquitär vorkommende, mitochondriale Elektronentransportproteine handelt.

Für Adrenodoxin-Reduktase findet sich beim Menschen ein einziges Gen, das auf Chromosom 17 lokalisiert ist (Hanukoglu et al., 1987). Für Adrenodoxin hingegen finden sich multiple Gene, die alle für ein identisches Protein kodieren (Morel et al., 1988).

### **1.4.4 Expression der Ko-Enzyme im Nervensystem**

Die beiden Ko-Faktoren Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase sind für alle mikrosomalen und mitochondrialen Cytochrome-P450-Enzyme von essentieller funktioneller Wichtigkeit. Erwartungsgemäß finden sich daher sowohl bei der Maus als auch bei der Ratte beide Enzyme in verschiedenen Lokalisationen des ZNS. So konnte

mittels RT-PCR im Cortex, im Cerebellum und im Hirnstamm die Präsenz von mRNA von Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase nachgewiesen werden (Stromstedt und Waterman, 1995).

#### 1.4.5 Regulation der Steroid-Biosynthese

Im Gegensatz zu den gut untersuchten Abläufen der Steroid-Biosynthese und den daran beteiligten Enzymen, sind die molekularen Mechanismen der hormonellen Regulation und die gewebsspezifische Expression der Cytochrom-P450-Enzyme bisher nur unzureichend untersucht und verstanden.

Bei der Regulation der Steroidogenese unterscheidet man prinzipiell zwischen akuten und chronischen Effekten. Während der akuten Phase kommt es aufgrund einer größeren Verfügbarkeit des gemeinsamen Vorläufersteroids Cholesterin in den Mitochondrien innerhalb weniger Minuten zu einer gesteigerten Steroidproduktion (Orme-Johnson, 1990). Bei diesem Prozess ist das *Steroid Acute Regulatory* (STAR) Protein beteiligt (Stocco, 2001), das für den Cholesterintransport von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist. Während der chronischen Phase hingegen kommt es zu einer Steigerung der Transkription des CYP11a1-Gens, was zu einem Anstieg von P450<sub>scc</sub>-Enzym in den Mitochondrien und konsekutiv zu einem erhöhten Umsatz von Cholesterin in Pregnenolon führt. Die maximalen Effekte dieser Gen-Aktivierung werden typischerweise erst Stunden nach Stimulation gesehen (Hanukoglu et al., 1990).

Während des ovariellen Zyklus wird die Transkription des CYP11a1-Gens und damit die Aktivität von P450<sub>scc</sub> durch die Gonadotropine LH und FSH gesteuert (Marsh, 1976), die ihre hormonelle Wirkung durch die Aktivierung einer G-Protein-gekoppelten Adenylatzyklase entfalten. Hierdurch kommt es zu einer Erhöhung der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem intrazellulären *second messenger* (Kramer et al., 1984). In der Nebennierenrinde wird die Expression von P450<sub>scc</sub> durch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), das dem Hypophysenvorderlappen entstammt, gesteuert (John et al., 1986). Wie schon für das Ovar und LH bzw. FSH beschrieben, so kommt es auch in der Nebenniere unter dem Einfluss von ACTH zu einer Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dies

führt zum einen zu einer intrazellulären Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), die dann in der Lage ist, spezifisch Serin- und/oder Threoninreste ausgewählter Proteine zu phosphorylieren, und zum anderen zu einer direkten Aktivierung des *cAMP-responsive element binding protein* (CREB). Obwohl die Transkription vieler Cytochrom-P450-Enzyme durch hormonelle Einflüsse gleichsam aktiviert wird, konnte für die verschiedenen Gene kein einheitliches Stimulationselement im Promoterbereich entdeckt werden. Dennoch fanden sich verschiedene regulatorische Sequenzen, die für eine cAMP-vermittelte Stimulation dieser Gene von Bedeutung sind. Hierzu gehören Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren wie CREB, Sp1, AP-1, AP-2 und SF-1.

#### 1.4.5.1 Regulation von P450<sub>scc</sub> in den Gonaden und der Nebenniere

Für die Transkription des CYP11a1-Gens konnten bislang mehrere regulatorische Proteine, die an spezifische DNA-Sequenzen im Bereich des Promoters binden, identifiziert werden. Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist der *Steroidogenic Factor-1* (SF-1), der bei Säugetieren ein Homolog des Fushi-Tarazu-Faktors-1 (FTZ-F1) von *Drosophila melanogaster* ist (Lala et al., 1992). Es handelt sich hierbei um ein Mitglied der Steroidhormonrezeptor-Familie, für das bislang jedoch noch kein natürlicher Ligand gefunden werden konnte, weshalb es auch als „verwaister“ Steroidhormonrezeptor (*orphan nuclear hormone receptor*) bezeichnet wird. Im Gegensatz zu den meisten anderen Steroidhormonrezeptoren bindet SF-1 als Monomer an eine DNA-Sequenz ([C/T]CAAGG[T/C]CA), die auch als Steroidhormonrezeptor-Halbseite (*nuclear hormone receptor half site*) bezeichnet wird. Dieses Element findet sich in den Promoterbereichen aller an der Steroidogenese beteiligten Enzyme. Aufgrund der Tatsache, dass zum einen SF-1 (oder adrenales Bindungsprotein 4 [Ad4BP]) in allen klassischen steroid-produzierenden Geweben gefunden wird und zum anderen alle an der Steroidogenese beteiligten Enzyme vieler Spezies ein SF-1 Bindungsmotiv im Promoterbereich aufweisen, wurde lange Zeit angenommen, dass SF-1 für die Expression dieser Enzyme von essentieller Bedeutung ist.

Die stärkste Expression von SF-1 findet sich in der Nebennierenrinde und den männlichen und weiblichen Gonaden. Darüber hinaus wird SF-1 in einigen Zellen der

Hypophyse und im ventromedialen Kerngebiet des Hypothalamus exprimiert (Hammer und Ingraham, 1999). Neben der funktionellen Bedeutung für die Transkription der steroidogenen Enzyme ist SF-1 unabhömmlich für die embryonale Anlage der Nebenniere und Gonaden sowie für den Differenzierungsprozess des männlichen und weiblichen Geschlechts. So fehlen Mäusen mit einer homozygoten Disruption des SF-1 Gens (SF-1<sup>-/-</sup>) sowohl Nebennieren, Gonaden als auch das Kerngebiet des ventromedialen Hypothalamus (Luo et al., 1994; Sadovsky et al., 1995). Auch auf Niveau der Hypophyse findet sich eine stark reduzierte Expression der Gonadotropine, wodurch es in der Zirkulation zu nicht messbaren Serumspiegeln von LH/FSH kommt. Wie aufgrund der Expressionsdaten zu erwarten, zeigt die SF-1<sup>-/-</sup> Maus, dass SF-1 für die reproduktive Funktion auf allen drei Ebenen der hypothalamisch-hypophysären-gonadalen Achse von essentieller Wichtigkeit ist. Kurz nach ihrer Geburt versterben die SF-1<sup>-/-</sup> Mäuse erwartungsgemäß an der Nebennierenrindeninsuffizienz.

Das CYP11a1-Gen der Ratte sowie 940 bp der Promoterregion wurden erstmals 1990 kloniert (Oonk et al., 1990). Durch Primer-Extensionsanalyse konnte der Transkriptionsstart 32 bp stromaufwärts des Startcodons kartiert werden. Vergleichende Sequenzanalysen zeigten, dass die Promoterregion des CYP11a1-Gens der Ratte, der Maus, des Rinds und des Menschen drei sehr konservierte Regionen besitzt. Diese drei Elemente finden sich innerhalb der ersten 200 bp des Promoters. In mehreren Arbeiten konnte durch Transfektionsexperimente gezeigt werden, dass es sich bei diesen drei Elementen um DNA-Sequenzen handelt, die bei der transkriptionellen Regulation des CYP11a1-Gens der Ratte (Chau et al., 1997; Clemens et al., 1994; Oonk et al., 1990; Zhang et al., 1995), der Maus (Rice et al., 1990), des Rindes (Ahlgren et al., 1990; Ahlgren et al., 1999; Liu und Simpson, 1997; Liu und Simpson, 1999; Venepally und Waterman, 1995) und des Menschen (Guo et al., 1994; Rodriguez et al., 1997) eine funktionelle Rolle spielen. Die ersten beiden Elemente, SCC1 [-58/-38] und SCC2 [-83/-64], bestehen bei der Ratte und der Maus aus einer invertierten und einer exakten Kopie eines Steroidhormonrezeptor-Halbseitenmotivs [AGGTCA] und können von SF-1 gebunden werden (Chau et al., 1997; Clemens et al., 1994; Liu und Simpson, 1997; Rice et al., 1990; Zhang et al., 1995). Diese beiden Elemente sind in klassischen steroidproduzierenden Geweben wie den Nebennieren (Y-1 Zellen) und Leydig-Zellen des Hodens (MA-10 Zellen) insbesondere für die basale, konstitutive Expression des

CYP11a1-Gens in klassischen steroid-produzierenden Geweben von funktioneller Bedeutung (Chau et al., 1997; Clemens et al., 1994; Rice et al., 1990; Zhang et al., 1995).

Eine Hormon-induzierte Aktivierung der Transkription durch den *second messenger* cAMP wird in klassischen steroid-produzierenden Geweben durch ein weiter stromaufwärts liegendes, ebenfalls sehr konserviertes Element des CYP11a1-Promoters vermittelt. Bei diesem Element handelt es sich um eine GC-reiche DNA-Sequenz, die von Mitgliedern der Sp-Proteinfamilie, insbesondere Sp1, gebunden werden kann (Ahlgren et al., 1999; Chou et al., 1996; Guo et al., 1994; Liu und Simpson, 1997; Momoi et al., 1992; Venepally und Waterman, 1995).

---

```

- 150 AGAAAGCTAG AAAGTTCTTT CTCTGCGTTT CTCTGCGTTT GC-Box
                                     GGGCGGGGC
- 100 AGCCCTCTGG TGGAGGAGGG GGGAGGTCAA CACTCCATCA GTCCTCTCT
                                     SCC2
- 50 TAGCCTTGAG CTAGTTAGTG GTTATAAGTG TGGCTCTGGA GGTTTGGGGC
                                     SCC1
0   AGAGACACTT GTGCAGCAGG
    
```

---

**Abbildung 4** Sequenz des 5' flankierenden Bereichs des CYP11a1-Gens  
 Der Pfeil deutet den Transkriptionsstart an, die TATA-Box ist dick gedruckt, SCC1, SCC2 und GC-Box sind konservierte Motive, die für die Transkription des CYP11a1-Gens von funktioneller Bedeutung sind (siehe Text) (Zhang et al., 1995).

---

#### 1.4.5.2 ... in glialen C6-Zellen

Neben den klassischen Geweben der Steroidbiosynthese wird P450scc in anderen Geweben, wie dem Nervensystem, exprimiert. Die Expression von P450scc auf mRNA- und Proteinebene ist im Nervensystem jedoch deutlich niedriger als in Nebennieren oder Gonaden (Compagnone et al., 1995a; Mellon und Deschepper, 1993), was auf eine gewebespezifische Regulation der Transkription von P450scc hindeutet. Diese Unterschiede werden zumindest teilweise dem Transkriptionsfaktor SF-1 zugeschrieben, der zwar in den Gonaden und Nebennieren eine Schlüsselrolle für die Transkription aller an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme einzunehmen scheint, aber im Gehirn nur im ventromedialen Hypothalamus und in einigen Zellpopulationen der Hypophyse exprimiert wird und damit für die Regulation von P450scc in vielen

Teilen des Nervensystem keine Rolle zu spielen scheint (Stromstedt und Waterman, 1995). Darüber hinaus konnte eine SF-1-unabhängige Expression von P450<sub>scc</sub> bereits in anderen Geweben wie dem embryonalen Darm (Keeney et al., 1995) und der Placenta (Sadovsky et al., 1995) nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, wird P450<sub>scc</sub> im zentralen Nervensystem vor allem in Gliazellen exprimiert, weshalb die C6-Gliazelllinie nicht zuletzt aufgrund ihrer endogenen Expression von P450<sub>scc</sub> ein geeignetes Zellmodell zur Untersuchung der molekularen Regulationsmechanismen zu sein scheint (Mellon und Deschepper, 1993).

Die minimale P450<sub>scc</sub>-Promotерlänge, gemessen vom Transkriptionsstart, die in C6-Zellen für eine Aktivierung des Reportergens ausreichend war, betrug in einer zuvor durchgeführten Studie 130 bp (Zhang et al., 1995); eine Deletion von 94 bp hingegen zeigte in den C6-Zellen keine Aktivität mehr. In MA-10-Zellen jedoch war dasselbe Promoterfragment von 94 bp Länge noch aktiv. Diese basale Aktivität konnte auf die Bindung des Transkriptionsfaktors SF-1 an die beiden SF-1-Bindungsstellen SCC1 und SCC2 zurückgeführt werden. Da SF-1 in MA-10, nicht jedoch in C6-Zellen exprimiert wird, zeigt dasselbe Promoterfragment in diesen beiden Zelllinien unterschiedliche Aktivitäten. Ein weiterer transkriptioneller Unterschied von P450<sub>scc</sub> in MA-10 und C6-Zellen zeigte sich im Bereich zwischen -130 und -94. Dieser Bereich liefert in MA-10-Zellen nur basale Aktivität, in C6-Zellen hingegen war dieser Bereich nicht nur konstitutiv aktiv, sondern ließ sich darüber hinaus durch cAMP stimulieren (Zhang et al., 1995). In Gelretentionsanalysen des -130/-94 Bereichs konnte gezeigt werden, dass ein Protein aus einem C6-Zellproteinextrakt sequenzspezifisch an die transkriptionell aktive -130/-94 Region bindet und dass eine zentrale GC-reiche Sequenz (Abbildung 4) hierbei für die Proteinbindung entscheidend ist. In Übereinstimmung mit den Bindungsdaten resultierte eine Mutation der GC-reichen Region in Transfektionsexperimenten auch in einem Verlust der transkriptionellen Aktivität. In weiteren Transfektionsexperimenten mit einem 230 bp langen Fragment des P450<sub>scc</sub>-Promoters konnte gezeigt werden, dass sich in dem Bereich zwischen -130 und -230 weitere funktionell wichtige Elemente befinden, die sich darüber hinaus ebenfalls durch cAMP stimulieren ließen (Zhang et al., 1995).

Diese Experimente zeigten, dass das P450<sub>scc</sub>-Gen in der glialen Zelllinie C6 wie erwartet anders reguliert wird als in der testikulären MA-10 Leydigzelllinie. Die für

diese gewebespezifischen Unterschiede verantwortlichen (Transkriptions-)Faktoren konnten jedoch bislang nur zum Teil geklärt werden.

## 1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die gewebespezifische transkriptionelle Regulation des CYP11a1-Gens, das für das Schlüsselenzym der Steroidogenese, P450<sub>scc</sub>, kodiert. Neben den klassischen Steroidhormon-produzierenden endokrinen Drüsen wie Gonaden und Nebenniere wird das P450<sub>scc</sub>-Enzym auch im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert und ist dort an der Synthese von Neurosteroiden beteiligt. Im Gegensatz zu den klassischen Geweben der Steroidogenese ist die transkriptionelle Regulation des CYP11a1-Gens im Nervensystem bislang nur wenig untersucht und daher nur unzureichend verstanden. Eine in diesem Zusammenhang durchgeführte Arbeit konnte bereits erste gewebespezifische Unterschiede in der transkriptionellen Regulation des CYP11a1-Gens in einer Leydig-Zelllinie der Maus im Vergleich zu einer glialen Zelllinie der Ratte herausarbeiten. Die an der Expression des CYP11a1-Gens in glialen Zellen beteiligten Transkriptionsfaktoren konnten bislang allerdings nicht identifiziert werden.

Hieraus ergibt sich für diese Arbeit folgende Fragestellung:

- 1) **Welches Protein der C6-Zellen bindet an die GC-reiche Region zwischen -130 und -94 des P450<sub>scc</sub>-Promoters und aktiviert dadurch die Transkription des CYP11a1-Gens in Gliazellen ?**
- 2) **Welche anderen Promotersequenzen zwischen -230 und -130 sind darüber hinaus an der transkriptionellen Regulation des CYP11a1-Gens in C6-Zellen beteiligt und welche Transkriptionsfaktoren sind hierbei involviert ?**

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Die in den Experimenten benutzten C6-Zellen sind eine Zelllinie, die von einem N-Nitrosomethylharnstoff-induzierten glialen Tumor der Ratte stammen (Benda et al., 1968). Die Zellen wurden bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in DMEH-21 mit 4.5 mg Glucose/ml und 10% fötalem Rinder-Serum (FBS) kultiviert, das mit L-Glutamin [2 mM] und Penizillin / Streptomycin [100 U/ml] versehen wurde.

### 2.2 Extraktion nukleärer Proteine aus kultivierten Zellen

Nachdem die Zellen in der Kultur eine Dichte von 60-70% erreicht hatten, wurde zunächst das Nährmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Durch Zugabe von PBS mit 3 mmol/l EDTA wurden die Zellen von den Kulturflaschen gelöst. Alle folgenden Schritte wurden zur Vermeidung von Degradation der Proteine bei 4° C ausgeführt. Die Zellen wurden zunächst bei 800 x g für 10 Min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Volumen der Zellen abgeschätzt, um danach die Zellen in einem vierfachen Volumen des Puffers A, dem zuvor 0.1 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma), 5 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml Chymostatin, 4 mg/ml Pepstatin, 5mg/ml Leupeptin und 0.1 mg/ml  $\alpha$ -1 Antitrypsin (Boehringer Mannheim) zur Proteaseninhibition zugesetzt wurde, zu resuspendieren. Die Zellsuspension wurde nun für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die durch diesen Inkubationsschritt geschwollenen Zellen wurden mit einem Glas-Homogenisator und einem Stempel (B-Typ) homogenisiert, bis lichtmikroskopisch ungefähr 95% der Zellen lysiert waren. Anschließend wurden die verbliebenen Zellkerne bei 3000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand der zytoplasmatischen Proteinfraction und der Mikrosomen wurde bei -70°C tiefgefroren.

Die Zellkerne wurden nun in einem zweifachen Volumen des Puffers B, der zuvor mit 0.2% Nonidet P-40 (ICN Biomedicals) versehen wurde, resuspendiert und die nukleären Proteine für 30 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler extrahiert. Anschließend wurden die nukleären Zellmembranen und das Chromatin bei 16,000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und präzipitiert. Der Überstand mit den nukleären Proteinen wurde dekantiert und über Nacht bei 4°C unter langsamem Rühren gegen Puffer C dialysiert. Am folgenden Tag wurde die Proteinkonzentration kolorimetrisch mit der Bradford-Methode (BCA Assay Kit [Pierce]) bei 560 nm gemessen. Die so gewonnenen nukleären Proteine wurden bei -70°C tiefgefroren.

|          |                          |
|----------|--------------------------|
| Puffer A | 10 mM Hepes pH 7.9       |
|          | 10 mM KCl                |
|          | 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> |
|          | 1 mM DTT                 |

|          |                   |
|----------|-------------------|
| Puffer B | 20 mM Hepes H 7.9 |
|          | 10 mM KCl         |
|          | 20 % Glycerol     |
|          | 1 mM DTT          |
|          | 1 mM PMSF         |

|          |                    |
|----------|--------------------|
| Puffer C | 20 mM Hepes pH 7.9 |
|          | 100 mM KCl         |
|          | 20% Glycerin       |
|          | 1 mM DTT           |
|          | 1 mM PMSF          |

### 2.3 Die elektrophoretische Gelretentionsanalyse (EMSA)

Die Gelretentionsanalyse ist eine schnelle, sehr sensitive Methode zur Detektion von DNA-bindenden Proteinen (Fried und Crothers, 1981). Das Prinzip

dieses Assays beruht auf der Tatsache, dass Proteine, die sequenzspezifisch an eine radioaktiv markierte DNA-Sonde binden, aufgrund des höheren molekularen Gewichts langsamer durch ein Polyakrylamidgel wandern als freie, nicht von Proteinen gebundene DNA. Dies resultiert dann in einer einzelnen oder mehreren Banden, die jeweils einem individuellen Protein:DNA-Komplex entsprechen. Als Ausgangsmaterial für diesen Assay können sowohl komplette Zellextrakte als auch (partiell) aufgereinigte Proteine verwendet werden.

### **2.3.1 Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde mit $^{32}\text{P}$**

#### **2.3.1.1 Anlagerung zweier komplementärer DNA-Einzelstränge**

Zur Anlagerung von komplementären, einzelsträngigen Oligonukleotiden wurden der *sense*- und der *antisense*-Strang zunächst für 5 Minuten in *Annealing Buffer* auf 100°C erhitzt und dann langsam wieder auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt.

#### **2.3.1.2 Radioaktive Markierung von DNA durch T4-DNA-Kinase**

Zur radioaktiven Markierung der 5'-Enden der DNA wurden 100 pmol des doppelsträngigen Oligonukleotids für 30 Minuten bei 37°C mit 1µl T4-Kinase (10 U/µl) (Gibco BRL), 5µl  $\gamma^{32}\text{P}$  ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) und 4µl [5 x] T4-Kinase Puffer (Gibco BRL) in einem Gesamtvolumen von 20µl inkubiert. Die Oligonukleotidsonde wurde mit Hilfe eines 10%-Polyakrylamidgels und eines [1x] TBE-Puffers von der nicht inkorporierten Radioaktivität bei 150V für 45 Minuten separiert. Nach Lösen der vorderen Glasplatte wurde der Fleck des Gels, der das radioaktive Oligonukleotid enthielt, mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und die DNA über Nacht in 400µl Wasser extrahiert.

#### **2.3.1.3 Natriumacetat/Ethanol-Präzipitation von DNA**

Zur Präzipitation von DNA wurde zunächst das Volumen der Lösung mit der zu präzipitierenden DNA bestimmt. Zu dieser Lösung wurden zunächst 10µg tRNA, 1/10 (v/v) [3 M] Natriumacetat und zuletzt 2.5 x (v/v) Ethanol hinzugefügt, woraufhin

das Gemisch 30 Sek. auf höchster Stufe gevortext und anschließend für 15 Minuten bei 13,000 x g zentrifugiert wurde. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das DNA-Pellet vorsichtig mit 70% Ethanol gewaschen und nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes und erneuter Zentrifugation an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in TE-Buffer resuspendiert.

#### 2.3.1.4 Protein:DNA-Bindungsreaktion

Die Gelretentionsanalyse wurde prinzipiell auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Entweder wurden 5-10 µg des Proteinextraktes oder ein Aliquot einer aufgereinigten Fraktion für 30 Min. in *Binding Buffer* in der Anwesenheit von bovinem Serumalbumin (BSA) (100 ng/µl), polydI\*dC (50 ng/µl) (Sigma) und ~ 50,000 cpm der Oligonukleotidsonde in einem Gesamtvolumen von 10 µl inkubiert. Oder, um unspezifische Protein:DNA-Bindungen zu minimieren, wurde der Proteinextrakt zunächst ohne DNA-Sonde für 30 Min. in Anwesenheit von Puffer, BSA und polydI\*dC inkubiert. Erst nach diesem Inkubationsschritt wurde dann die DNA-Sonde dazugegeben. Dieses Vorgehen ermöglicht es, unspezifische Protein:Sonden-Interaktionen durch vorherige Bindung an unspezifischen Kompetitor (polydI\*dC) zu minimieren, bevor die Sonde zu den verbliebenen, sequenzspezifischen Proteinen hinzugegeben wird. In *Supershift*-Experimenten wurde der entsprechende Antikörper immer gleichzeitig mit dem Proteinextrakt, in Kompetitions-Experimenten immer die „Kalte“, also nicht radioaktive DNA gleichzeitig mit der Sonde zur Bindungsreaktion dazugegeben.

#### 2.3.1.5 Elektrophoretische Auftrennung und Autoradiographie

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde ein 6%-iges, nicht denaturierendes Polyakrylamidgel gegossen, welches vor dem Auftragen der Proben 5 Min. bei 50 mA aufgewärmt wurde. Nach Säuberung der Taschen mit Hilfe einer Spritze wurden die Proben aufgetragen und für 60 Minuten bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel auf ein Saugpapier (Whatman) überführt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und mit Hilfe eines Vakuumtrockners getrocknet. Zur Autoradiographie

wurde der zu exponierende Röntgenfilm für 12 Stunden zwischen einer Verstärkerfolie und dem Gel bei  $-70^{\circ}\text{C}$  exponiert und am folgenden Tag entwickelt.

|                  |   |
|------------------|---|
| Annealing Buffer | 20 mM Tris-HCl<br>10 mM $\text{MgCl}_2$ |
|------------------|---|

|                |   |
|----------------|---|
| Binding Buffer | 20 mM HEPES pH 7.9<br>50 mM KCl<br>2 mM $\text{MgCl}_2$<br>200 $\mu\text{M}$ $\text{ZnCl}_2$<br>12 % Glycerin |
|----------------|---|

|               |  |
|---------------|--|
| EMSA-Gel [6%] | 7.5 ml [40%] Akrylamid/Bisakrylamide (29:1)<br>2.5 ml [10 x] TBE Buffer<br>0.2 ml [100 mg/ml]APS<br>39.8 ml ddH <sub>2</sub> O |
|---------------|--|

|            |  |
|------------|--|
| TBE Buffer | 89 mM Tris-Base<br>89 mM Borsäure<br>2 mM EDTA, pH 8.0 |
|------------|--|

|           |   |
|-----------|---|
| TE Buffer | 10 mM Tris-HCl, pH 8.0<br>1 mM EDTA, pH 8.0 |
|-----------|---|

## 2.4 Der DNase I-Footprinting Assay

Der Desoxyribonuklease I-*Footprinting Assay* ist eine wichtige Methode zur Lokalisation von spezifischen Proteinbindungsstellen auf DNA (Galas und Schmitz, 1978). Dieser Assay nutzt die Tatsache, dass an DNA gebundene Proteine das Molekül an der Bindungsstelle vor dem Angriff der Nuklease schützen. Zur Detektion verwendet man einseitig radioaktiv markierte DNA, die zusammen mit dem zu untersuchenden

Proteinextrakt inkubiert wird. Nach Titrierung einer geeigneten Menge von DNase I wird erreicht, dass statistisch jedes DNA-Molekül nur einmal von der Nuklease geschnitten wird. Dadurch entstehen DNA-Moleküle mit, je nach dem wo die Nuklease das Phosphodiester-Rückgrat der DNA hydrolysiert hat, unterschiedlichen Längen. Fragmente, die durch gebundene Proteine geschützt wurden, werden hierbei ausgespart, was nach elektrophoretischer Auftrennung als „Löcher“ in einer „Leiter“ imponiert, wobei jede „Sprosse“ der Leiter einem DNA-Fragment einer bestimmten Länge entspricht.

## **2.4.1 Herstellung eines markierten P450<sub>scc</sub>-Promoterfragments**

### 2.4.1.1 Radioaktive Markierung des 5'- und 3'-Primers

Für die Darstellung von Protein:DNA-Interaktionen im Bereich -230 und -130 des P450<sub>scc</sub>-Promoters wurde ein 5'-Primer, der sich ~ 40 bp stromaufwärts und ein 3'-Primer, der sich ~ 40 bp stromabwärts dieses Bereiches befindet, für eine Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) synthetisiert. Zur Detektion von Protein:DNA-Interaktionen auf dem *sense*-Strang wurden 200 pmol des 5'-Primers, zur Detektion von Interaktionen auf dem *antisense*-Strang 200 pmol des 3'-Primers radioaktiv mit  $\gamma^{32}\text{P}$  ATP und T4-Kinase endmarkiert (2.3.1).

### 2.4.1.2 Phenol/Chloroformextraktion von DNA

Für die Phenol/Chloroformextraktion wurde das Volumen der zu extrahierenden DNA durch Zugabe von Wasser auf 200  $\mu\text{l}$  erhöht und danach ein gleiches Volumen (200  $\mu\text{l}$ ) an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) dazugegeben und die Emulsion für 30 Sek. auf höchster Stufe gevortext. Nach einminütiger Zentrifugation bei 12,000 x g wurde die obere, wässrige Phase mit der DNA vorsichtig von der unteren, organischen Phase abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit Natriumacetat/Ethanol (2.3.1.3) präzipitiert.

### 2.4.1.3 PCR-Amplifikation des -270/-90 P450scc-Promoterfragments

Für die PCR-Amplifikation wurden 20pM eines radioaktiv markierten Primers und dieselbe Menge des korrespondierenden „kalten“ Primers, 1 pg *Template* DNA, 2.5 µl [10X] PCR-Buffer, 1 µl [5 mM] dNTP, 0.2 µl Taq-Polymerase [5 U/µl] (Gibco BRL) und Wasser in einem Gesamtvolumen von 25 µl in ein 0,2 ml PCR-*Tube* pipettiert. Die PCR-Reaktion wurde in einem Robocycler (Stratagene) nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

#### Temperaturprofil der PCR

|          |              |
|----------|--------------|
| 1 Zyklus | 95°: 2 Min.  |
| 1 Zyklus | 95°: 30 Sek. |
|          | 58°: 30 Sek. |
|          | 72°: 1 Min.  |
| 1 Zyklus | 72°: 5 Min.  |

#### Primer zur Amplifikation des -270/-90-Promoterfragments

|                |      |                                  |
|----------------|------|----------------------------------|
| 5'-Primer (S)  | -270 | 5'-GAATTCTTGCCTTTTAACCTGTCTCC-3' |
| 3'-Primer (AS) | -94  | 5'-CGGGATCCGAGGGCTGGGCCACAC-3'   |

Das durch die PCR amplifizierte, auf einer Seite radioaktiv markierte, 190 bp lange Promoterfragment wurde durch Elektrophorese auf einem 2%-igem Agarose-TBE Gel von überschüssigen Primern und dNTPs getrennt, ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe eines QIAquick *Gel Extraction Kits* (Qiagen) aus dem Gel extrahiert.

### 2.4.1.4 Herstellung eines DNA-Markers nach Maxim & Gilbert

Ein DNA Marker wurde durch Behandlung des radioaktiven Promoterfragments mit Piperidin (Sigma) erzeugt, wodurch es zu einer chemischen Spaltung der DNA nach den Basen „A“ und „G“ kommt. Für die Herstellung von 10 Aliquots des Markers wurden ~ 300,000 cpm der DNA-Sonde mit 7 µl [10%] Ameisensäure und Wasser in einem Gesamtvolumen von 28 µl bei 37° C für 8 Min. inkubiert. Die DNA wurde mit

Natriumacetat/Ethanol präzipitiert (2.3.1.3) und das getrocknete DNA-Pellet in 100  $\mu$ l Wasser und 10% Piperidin resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 Min. bei 90° C. wurde die Reaktion auf Eis gestoppt, die DNA erneut mit Natriumacetat/Ethanol präzipitiert (2.3.1.3) und die DNA in *Loading Buffer* resuspendiert.

#### 2.4.1.5 Protein:DNA-Bindungsreaktion

Für den DNase I-katalysierten Verdau der DNA wurden ~ 300,000 cpm der Sonde, zusammen mit 1  $\mu$ g poly dI\*dC (Sigma), 4  $\mu$ g BSA und *Binding Buffer* zusammen mit dem oder ohne den nukleären C6-Proteinextrakt für 30 Min. bei RT inkubiert. Danach wurden Magnesiumchlorid und Calciumchlorid in einer Endkonzentration von 2.5 mM bzw. 5 mM der Reaktion zugegeben. Nach einer Minute wurde dann eine zuvor ermittelte geeignete Menge der DNase I (Gibco BRL) den Reaktionen zugegeben und exakt für 30 Sek. bei 26°C inkubiert. Die Reaktionen wurden gestoppt, indem sie auf Eis gestellt und mit Stopp-Puffer versehen wurden. Anschließend wurde die DNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.4.1.2) von den Proteinen gereinigt, mit Natriumacetat/Ethanol präzipitiert (2.3.1.3) und in *Loading Buffer* resuspendiert.

#### 2.4.1.6 Elektrophoretische Auftrennung

Vor dem Laden des Gels wurde dieses durch einen 30-minütigen Vorlauf bei 50 W gleichmäßig erwärmt. Danach wurden die Taschen mit Hilfe einer Spritze von Harnstoff befreit und die Proben, die unmittelbar vorher für 2 Min. bei 95°C denaturiert wurden, auf das 6%-ige denaturierende Polyakrylamidgel geladen. Nun erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente für 90 Minuten. Das Gel wurde getrocknet und autoradiographiert wie zuvor beschrieben (2.3.1.5).

|                |                    |
|----------------|--------------------|
| Binding Buffer | 20 mM Hepes pH 7.9 |
|                | 50 mM NaCl         |
|                | 0.5 mM EDTA        |
|                | 10 % Glycerin      |

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| Stop Buffer | 20 mM EDTA<br>1 % SDS<br>0.2 M NaCl |
|-------------|-------------------------------------|

|                |   |
|----------------|---|
| Loading Buffer | 80% Formamid<br>100 mM NaOH<br>1 mM EDTA<br>0.1% (w/v) Bromphenol Blau<br>0.1% (w/v) Xylen Cyanol |
|----------------|---|

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Footprinting-Gel [6%] | 6 ml Long Ranger XL (FMC Bioproducts)<br>5 ml [10 x] Glycerol Tolerant Buffer (GTB)<br>23 g Harnstoff<br>0.5 ml [100 mg/ml] APS<br>ddH <sub>2</sub> O to 50ml |
|-----------------------|---|

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Glycerol Tolerant Buffer (GTB) | 89 mM Tris Base<br>29 mM Taurin<br>0.5 mM EDTA |
|--------------------------------|--|

## 2.5 Ammoniumsulfat-Präzipitation von Proteinen

Zur Separation der nukleären Proteine der C6-Zellen wurde eine Präzipitation mit Ammoniumsulfat gewählt. Das Prinzip dieses Aufreinigungsschrittes ist, dass unterschiedliche Proteine bei unterschiedlichen Konzentrationen eines gelösten Salzes aggregieren und sich dann aufgrund ihrer größeren Dichte durch Zentrifugation präzipitieren lassen. Ein hierfür häufig verwendetes Salz ist Ammoniumsulfat, da es zwischen 0°C und 30°C gut in Wasser löslich und in einer hohen Qualität verfügbar ist.

Zur Berechnung der Ammoniumsulfatmenge, die zum Erreichen einer definierten Konzentration benötigt wird, wurden folgende Formeln eingesetzt:

|     |   |
|-----|---|
| (a) | $g = 533 (M_2 - M_1) / (5.05 - 0.3 \times M_2)$ |
| (b) | $g = 533 (S_2 - S_1) / (100 - 0.3 \times S_2)$  |

Dabei entspricht „g“ der Menge Ammoniumsulfat in Gramm, die zu einem Liter Lösung zum Erreichen einer bestimmten molaren Konzentration ( $M_2$ ) (bzw. Sättigung [ $S_2$ ]), ausgehend von einer Ausgangskonzentration ( $M_1$ ) (bzw. Sättigung [ $S_1$ ]), hinzugefügt werden muss. Zunächst wurde eine 40%-ige gesättigte Lösung erstellt, indem 242 mg Ammoniumsulfat pro ml zu präzipitierender Lösung über 30 Min. und unter ständigem Rühren bei 4°C zu dem Proteinextrakt dazugegeben wurden. Anschließend wurden die aggregierten Proteine durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 10,000 x g präzipitiert.

Für den zweiten Präzipitationsschritt wurden pro Milliliter Überstand aus dem ersten Präzipitationsschritt, 130 mg Ammoniumsulfat wieder über 30 Min. unter langsamem Rühren zu der Lösung dazugegeben, wodurch eine zu 60% gesättigte Lösung hergestellt wurde. Die nun bei dieser höheren Konzentration aggregierten Proteine wurden ebenfalls bei 10,000 x g für 30 Min. präzipitiert.

Für den dritten Präzipitationsschritt wurden pro Milliliter Überstand aus dem zweiten Präzipitationsschritt nun 260 mg Ammoniumsulfat zu der Lösung dazugegeben, woraus eine zu 100% gesättigte Lösung entstand.

Die Protein-Pellets der drei Präzipitationsschritte wurden in 15 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (BCA Assay Kit, Pierce) bestimmt und die Protein-Lösungen bis zur weiteren Verwendung bei -70°C tiefgefroren.

## 2.6 Säulen-Chromatographische Auftrennung von Proteinen

Das Prinzip der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) ist, dass Proteine je nach ihren biochemischen Eigenschaften mehr oder weniger fest an die Matrix der verwendeten Säule binden. Nach dem Laden der Säule mit dem Proteinextrakt wird die Säule kontinuierlich mit steigenden Konzentrationen einer Salzlösung gewaschen. Dabei wird zunächst mit einer niedrigen Salzkonzentration begonnen, die langsam auf die gewünschte Endkonzentration gesteigert wird, bei der

alle Proteine ihre Bindung zu der Säule verloren haben. Die von der Säule gewaschenen Proteine wurden mit einem UV-Detektor (UB Detector, Model 440, Waters) bei 280nm gemessen und grob quantifiziert.

Für die Säulenchromatographie wurde eine 8ml-Anionen-Austauschsäule (Q 8HR FPLC, Waters, Milford) benutzt. Zur Reinigung wurde die Säule zunächst mit einem [1M] Natriumchlorid-Puffer gewaschen und anschließend mit dem *Equilibration Buffer* equilibriert. Die bei 60%-gesättigter Ammoniumsulfatlösung präzipitierten nukleären C6-Proteine wurden zunächst über Nacht bei 4° C gegen *Equilibration Buffer* dialysiert und am folgenden Tag für 10 Min. bei 100,000 x g zur vollständigen Entfernung von Proteinpräzipitaten zentrifugiert. Der Überstand (15 ml [2.5 mg/ml]) wurde dann luftblasenfrei auf die Säule geladen. Dabei zeigte sich, dass ungefähr 10% der geladenen Proteine nicht an die Säule banden. Diese Proteinfraction wurde gesammelt, bis die optische Dichte des Durchflusses bei 280 nm wieder Null war, und als *Flow Through* bezeichnet.

Die an die Säule gebundenen Proteine wurden dann mit einem linearen NaCl Konzentrationsgradienten von 0 mol/l bis 1 mol/l bei einer Flussrate von 1 ml/min über 60 Min. von der Säule eluiert. Es wurden Fraktionen von jeweils 3 ml gesammelt. Nach Beendigung der chromatographischen Auftrennung der Proteine erfolgte eine Analyse der gewonnenen Fraktionen mit der Gelretentionsanalyse.

|                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| Equilibration Buffer | 20 mM Tris-Cl pH 7.5 |
|----------------------|----------------------|

## 2.7 Auftrennung und Detektion von Proteinen

### 2.7.1 Polyakrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein zweischichtiges Gel, bestehend aus einem oberen ~ 2 cm messenden Sammelgel (*Stacking Gel*) und einem unteren ~ 7 cm messenden Trenngel (*Separating Gel*), gegossen. Dazu wurden die beiden Gel-Flüssigkeiten getrennt voneinander pipettiert, durchmischt, filtriert und in eine entsprechende Flasche zum Gießen der Gele umgefüllt.

Nach Zugabe von 20µl TEMED (Sigma) wurde zunächst das Trenngel gegossen, und nach Polymerisation desselben wurde analog für das Sammelgel verfahren.

Vor dem Laden der Proben auf das Gel wurden diese mit *Loading Dye* versetzt, zusammen mit einem Gewichtsmarker (Full Range Molecular Weight Marker [Amersham]) für 5 Minuten in kochendem Wasser denaturiert und anschließend in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die Proteine wurden bei 120 V für ~ 90 Min. aufgetrennt.

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Separating Gel [12%]       | 3 ml [40%] Akrylamid/Bisakrylamid (29:1)<br>2.5 ml [4x] Separating Buffer<br>0.2 ml [100 mg/ml] APS<br>4.3 ml ddH <sub>2</sub> O |
| Stacking Gel [6%]          | 1.5 ml [40%] Akrylamid/Bisakrylamid (29:1)<br>2.5 ml [4x] Stacking Buffer<br>0.2 ml [100 mg/ml] APS<br>5.8 ml ddH <sub>2</sub> O |
| SDS Electrophoresis Buffer | 50 mM Tris-Cl pH 8.3<br>196 mM Glycin<br>0.1 % SDS   |
| Stacking Buffer [4x]       | 125 mM Tris-Cl pH 6.8<br>0.1 % SDS   |
| Separating Buffer [4x]     | 375 mM Tris-Cl pH 8.8<br>0.1 % SDS   |

### 2.7.2 Western-Blot

Unter einem Western-Blot versteht man ein Verfahren, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (2.7.1) aus einem Trenngel auf einen geeigneten

Trägerfilter, z.B. Nitrocellulose oder Nylon, übertragen und immobilisiert werden. Dabei bleiben das ursprünglich im Gel enthaltene Trennmuster sowie die Immunreaktivität der Proteine nach der Übertragung auf den Filter erhalten.

### 2.7.2.1 Detektion von Protein durch immunologische Techniken

Als Immuno-Blotten bezeichnet man immunologische Techniken, bei denen man die auf Membranen transferierten Proteine mit geeigneten Antikörpern reagieren lässt. Die spezifische Bindung des primären Antikörpers mit dem nachzuweisenden Protein wird dann durch einen Sekundärantikörper detektiert, wobei der Sekundärantikörper klassischerweise mit einem Enzym markiert ist, durch den der Gesamtkomplex sichtbar gemacht werden kann.

Für die immunologische Detektion wurden die Proteine aus dem Trenngel mit Hilfe eines *Semidry Transfer Apparatus* auf eine 0.45 µm Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) übertragen. Dazu wurde ein aus vier Lagen bestehendes *Sandwich*, bestehend aus drei Whatman-Papieren als Boden, gefolgt von der Nitrocellulosemembran und dem Gel und wiederum drei Whatman-Papieren als Deckel, zusammengesetzt. Sämtliche Komponenten hatten die Ausmaße von 5.5 cm x 8.25 cm und wurden vorher in *Transfer Buffer* angefeuchtet und unter Ausschluss von Luftblasen sorgfältig aufeinander gelegt. Der Proteintransfer wurde bei 50 mA für 60 Min. durchgeführt.

Danach wurde die Membran zunächst in 10 ml PBS mit 5% (w/v) fettarmem Magermilchpulver und 0.2 % Tween 20 (Sigma) für 60 Min. inkubiert. Nun wurde die Membran in 50 ml PBS mit 0.2% Tween 20 (Waschlösung) für 15 Min. gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 10 ml Waschlösung mit dem verdünnten primären Antikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dann 3 mal für 15 Min. in 50 ml Waschlösung gewaschen. Danach wurde die Membran für eine Stunde in Waschlösung mit dem 1 : 5,000 bis 1 : 10,000 verdünnten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran erneut dreimal für 15 Min. in 50 ml Waschlösung gewaschen.

Zur Detektion des Antikörperkomplexes wurden die Membranen mit 6 ml, bestehend aus 3 ml einer Lösung #1 und 3 ml einer Lösung #2 eines ECL-Kits

(Amersham), beschichtet. Nach einer Minute wurde die Membran kurz getrocknet, in Klarsichtfolie eingehüllt und, je nach Signalstärke, für Sekunden bis Minuten flach aufliegend einem Röntgenfilm exponiert.

|                         |                      |
|-------------------------|----------------------|
| Semidry Transfer Buffer | 25 mM Tris-Cl pH 7.5 |
|                         | 192 mM Glycin        |
|                         | 20 % Methanol        |

### 2.7.2.2 Blotting-Technik zur Aminosäuren-Sequenzanalyse

Zur Aminosäurenanalyse einer Proteinbande wurde das Gel auf eine 0.2 µm PVDF-Membran (Sequi-Blot PVDF Membrane [Bio-Rad]) mit Hilfe eines Tanktransferapparats übertragen. Bei dieser Technik werden das Gel und die Membran, eingehüllt in Whatman-Papier, in einem Tank, der vollständig mit *Transfer Buffer* gefüllt wird, in vertikaler Ausrichtung zwischen zwei Elektroden platziert. Der Transfer wurde für 60 Min. durchgeführt.

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde die Membran für wenige Sekunden in Coomassie-Blau angefärbt und danach kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Zwei der Banden, von ungefähr 70 kDa und 80 kDa, wurden mit Hilfe einer Rasierklinge ausgeschnitten und nach der Edman-Degradationsmethode ansequenziert (Pro-Seq Inc., Salem 01970, Ma., U.S.A.).

|                      |               |
|----------------------|---------------|
| Tank Transfer Buffer | 10 mM CAPS    |
|                      | 10 % Methanol |

|                             |                                       |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| Coomassie Staining Solution | 0.05 % Coomassie Brilliant Blau R-250 |
|                             | 50 % Methanol                         |
|                             | 10 % Essigsäure                       |
|                             | 40 % ddH <sub>2</sub> O               |

### 2.7.3 Detektion von Proteinen durch Silberimprägnierung

Die Silberimprägnierung ist eine Methode zur Anfärbung von Proteinen in Gelen. Dabei reagiert Silber mit verschiedenen chemischen Gruppen der Proteine, wie z.B. Sulfhydryl- und Carboxylgruppen, wodurch sehr geringe Proteinmengen detektiert werden können. Somit ist diese Färbemethode ungefähr 200 Mal sensitiver als die Coomassie-Färbung. Für die Silberimprägnierung wurde ein kommerzieller Kit (Silver Stain Plus Kit [Bio Rad]) verwendet.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine und Entfernung des Sammelgels wurde zunächst das Trenngel für 20 Min. in 50 ml Fixierungslösung (*Fixing Solution*) fixiert und danach zweimal für 15 Min. in 200 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurde das Gel in der Silberfärbelösung (*Staining Solution*) auf einem Schüttler inkubiert, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht wurde. Der Färbeprozess wurde mit Wasser und 5%-iger Essigsäure gestoppt, das Gel anschließend zweimal für 15 Min. in 200 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und zum Trocknen über Nacht zwischen zwei Zellophanpapiere gespannt.

|                   |   |
|-------------------|---|
| Staining Solution | 5 ml Silver Complex Solution (SCS)      |
|                   | 5 ml Reduction Moderator Solution (RMS) |
|                   | 5 ml Image Development Reagent (IDR)    |
|                   | 50 ml Developer Enhancer                |
|                   | 35 ml dd H <sub>2</sub> O               |

|                 |                                  |
|-----------------|----------------------------------|
| Fixing Solution | 40 ml Essigsäure                 |
|                 | 40 ml Fixative Enhancer Solution |
|                 | 120 ml dd H <sub>2</sub> O       |
|                 | 200 ml Methanol                  |

## 2.8 Konstruktion von Luciferase-Reporter-Plasmiden

Unter Reporter genen versteht man Gene, dessen Genprodukte sich mit Hilfe einfacher Methoden nachweisen lassen. Die Expressionsstärke eines zu untersuchenden

Genpromoters wird dabei vor ein Reporter-gen kloniert. Die Aktivität des Reporters ist damit ein Maß für die Aktivität des zu untersuchenden Promoters. Für diese Methode ist es notwendig, chimäre Konstrukte herzustellen, die zum einen aus dem Promoter (-abschnitt) des zu untersuchenden Genes (P450scc) und zum anderen aus dem Reporter-gen (Luciferase) bestehen.

## 2.8.1 Subklonierung von Promoterabschnitten des P450scc-Gens

### 2.8.1.1 Subklonierung einer 190 bp Promoterdeletion des Cyp11a1-Gens

Zur Analyse der ersten 190 Basen des P450scc-Promoters wurde dieser Abschnitt vor ein Luciferase-Reporter-gen kloniert (Abbildung 5). Durch PCR eines bereits subklonierten 1,5 kb langen Abschnitts des P450scc-Promoters (Zhang et al., 1995) konnte durch entsprechende Primer das gewünschte, 190 bp lange Fragment amplifiziert werden. Zur weiteren Subklonierung wurde an den 5'-Primer ein Überhang mit einer Hind III-Schnittstelle, an den 3'-Primer eine Xho I-Schnittstelle angefügt (kursiv gedruckte Primersequenzen).

Für die PCR wurden 1 µl [20 pM] des 5'- und des 3'-Primers, 1 pg *Template* DNA, 2,5 µl [10x] PCR-Puffer, 1 µl [5 mM] dNTP, 0,2 µl Taq-Polymerase [5 U/µl] (Gibco BRL) und Wasser in einem Gesamtvolumen von 25 µl in ein 0,2 ml PCR-*Tube* pipettiert. Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

---



---

#### Temperaturprofil der PCR

---

|          |      |        |
|----------|------|--------|
| 1 Zyklus | 95°: | 2 Min. |
|----------|------|--------|

|          |      |         |
|----------|------|---------|
| 1 Zyklus | 95°: | 30 Sek. |
|----------|------|---------|

|  |      |         |
|--|------|---------|
|  | 54°: | 30 Sek. |
|--|------|---------|

|  |      |        |
|--|------|--------|
|  | 72°: | 1 Min. |
|--|------|--------|

|          |      |        |
|----------|------|--------|
| 1 Zyklus | 72°: | 5 Min. |
|----------|------|--------|

---

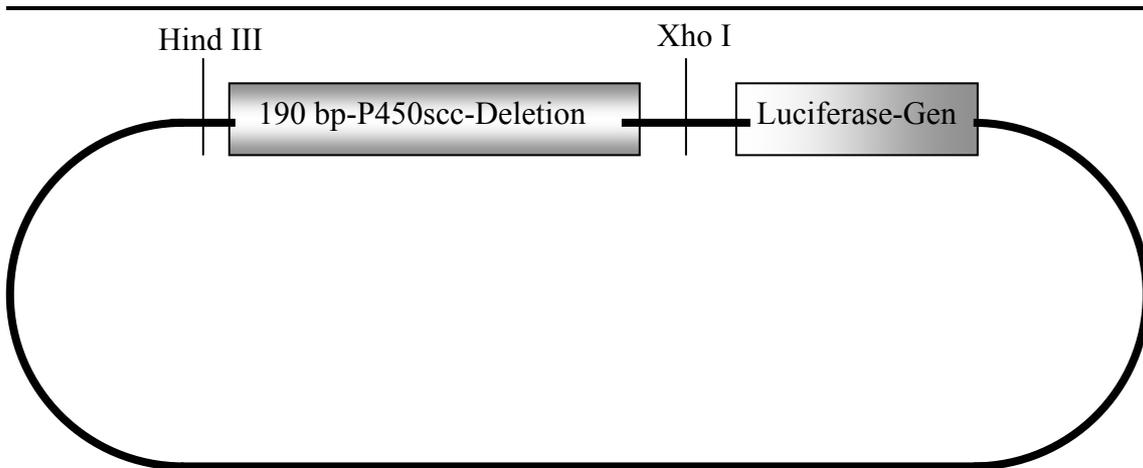
#### Primer zur Amplifikation einer 190 bp Promoterdeletionsmutanten

|               |      |                                  |
|---------------|------|----------------------------------|
| 5' Primer (S) | -270 | 5'-CCCAAGCTTCTGCCGGTGTTTGCCTA-3' |
|---------------|------|----------------------------------|

|                |     |                                  |
|----------------|-----|----------------------------------|
| 3' Primer (AS) | -94 | 5'-CCGCTCGAGTGCCACTTTCCTGCTGC-3' |
|----------------|-----|----------------------------------|

Das PCR-Produkt wurde mit Phenol/Choloroform extrahiert (2.4.1.2) und mit Natriumacetat/Ethanol präzipitiert (2.3.1.3). Anschließend wurde in zwei getrennten Ansätzen zum einen das PCR-Produkt und zum anderen 2 µg eines bereits vorhandenen Reporterplasmids, das 1.5 kb des P450scc-Promoters enthielt (Zhang et al., 1995), mit jeweils 1.5 µl der Restriktionsenzyme Hind III und Xho I in Puffer #2 (Gibco BRL) in einem Gesamtvolumen von je 30µl für eine Stunde bei 37° C verdaut. Das geschnittene Plasmid und das PCR-Produkt wurden nun auf ein 2%-iges Agarose-TBE-Gel zur Reinigung aufgetragen, die Banden des linearisierten Plasmids sowie des PCR-Produktes ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) aus dem Gel extrahiert.

Für die Ligation des Vektors mit dem Insert wurden 100 ng des Vektors und 20 ng der 190 bp langen P450scc-Promoterdeletion mit 10 *Units* T4 DNA-Ligase (Gibco BRL) für 2 h in dem dafür vorgesehenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei RT inkubiert.



**Abbildung 5** Karte des chimären -190 bp-P450scc-Luciferase-Plasmids  
Eine 190 bp Promoterdeletion wurde in die Hind III- und Xho I-Schnittstelle des Luciferase-Reportergens kloniert.

---

### 2.8.1.2 Subklonierung von kurzen Elementen des P450scc-Promoters

Zur gezielten funktionellen Analyse einiger Fragmente des P450scc-Promoters wurden Oligonukleotide (Tabelle 1), die zuvor in Gelretentionsanalysen auf ihre Bindungseigenschaften überprüft wurden, sowie die komplette -230/-151 Region des

P450scc-Promoters vor einen 36 bp langen Minimalpromoter des Prolaktins, der sich wiederum vor einem Luciferase-Reportergen befand, kloniert (Abbildung 6).

|               |                                  |
|---------------|----------------------------------|
| -185/-165 WT: | <u>GATCTGTTTGCCTAACTTTACCA</u>   |
| -185/-165 M3: | <u>GATCTGTTTGAAAACTTTACCA</u>    |
| -220/-200 WT: | <u>GATCAGACATTGAGGTCAGAGACC</u>  |
| -220/-200 M3: | <u>GATCAGACATTGTTTTTCAGAGACC</u> |

**Tabelle 1** Auflistung der subklonierten Oligonukleotide  
GATC-Überhänge zur Subklonierung in BamH I-Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Mutierte Basen sind durch fette Buchstaben hervorgehoben (die komplementären DNA-Stränge sind nicht dargestellt).

2µg des p36-Luciferase-Plasmids wurden mit 3 µl BamH I (Gibco BRL) und 3µl [10 x] Puffer in einem Gesamtvolumen von 30µl bei 37° C für 2 h verdaut. Das linearisierte Plasmid wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.4.1.2) und mit Natriumacetate/Ethanol (2.3.1.3) präzipitiert.

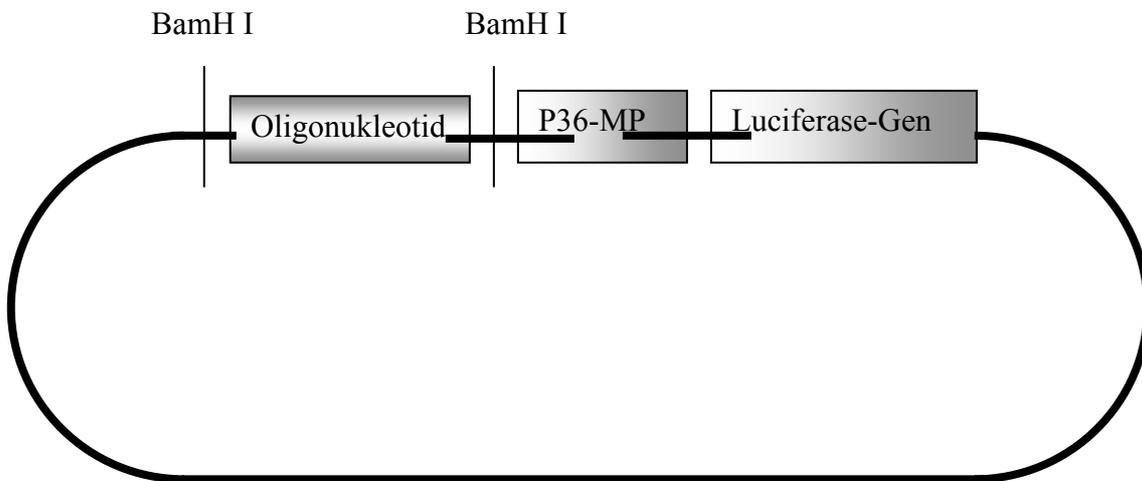
Ein 80 bp langer Bereich des P450scc-Promoters von -230 bis -151 wurde nach Synthese entsprechender Primer durch PCR amplifiziert. Für die PCR wurden 1 µl [20 pM] des 5'- und des 3'-Primers, 1 pg *Template* DNA, 2.5 µl [10x] PCR-Puffer, 1 µl [5 mM] dNTP, 0.2 µl Taq-Polymerase [5 U/µl] (Gibco BRL) und Wasser in einem Gesamtvolumen von 25 µl in ein 0,2 ml PCR-*Tube* pipettiert. Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

**Temperaturprofil der PCR**

|          |              |
|----------|--------------|
| 1 Zyklus | 95°: 2 Min.  |
| 1 Zyklus | 95°: 30 Sek. |
|          | 40°: 30 Sek. |
|          | 72°: 30 Sek. |
| 1 Zyklus | 72°: 5 Min.  |

Primer zur Amplifikation des -230/-151 Promoterbereichs

|                |      |                                |
|----------------|------|--------------------------------|
| 5'-Primer (S)  | -230 | 5'-CGGGATCCACCCATAAGGCAGACA-3' |
| 3'-Primer (AS) | -151 | 5'-GCGGATCCGTCTGAAAGGTCTGTG-3' |



**Abbildung 6** Karte des P450scc-p36-Luciferase-Plasmids.

Reporterkonstrukte wurden kloniert, um die transkriptionelle Aktivität von Oligonukleotiden des P450scc-Promoters zu analysieren. Die Oligonukleotiden sowie das -230/-150-Fragment des P450scc-Promoters wurden über 5'- und 3'-GATC-Überhänge in eine BamH I Schnittstelle des Vektors vor einen Prolaktin Minimalpromoter (P36-MP) kloniert.

Für die Ligation wurden 100 ng des Vectors und 1  $\mu$ l [100 pmol] eines doppelsträngigen Oligonukleotids oder 50 ng des -230/-151 PCR-Produktes zusammen mit 10 *Units* T4 DNA-Ligase (Gibco BRL) in dem dafür vorgesehenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l für 2 h bei RT inkubiert.

## 2.8.2 Transformation

Kompetente HB 101 *Escherichia coli* Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut, mit 2  $\mu$ l der Ligrationsreaktion gemischt und dann für 30 Min. auf Eis inkubiert. Für die Transformation wurden die Bakterien exakt 45 Sek. einem Hitzeschock von 42° C ausgesetzt und danach unmittelbar wieder auf Eis gekühlt. Anschließend wurde den Bakterien 1 ml LB-Medium zugegeben und die Suspension bei 37° C in einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 10 Min. bei 1000 x g zentrifugiert und der Mediumsüberstand bis auf 150  $\mu$ l dekantiert. Die Bakterien wurden dann in dem verbliebenen Überstand resuspendiert und auf selektiven, mit Ampicillin [100  $\mu$ g/ml] angereicherten Agarplatten gleichmäßig ausgestrichen. Die Agarplatten wurden dann über Nacht bei 37° C inkubiert.

|                     |                        |
|---------------------|------------------------|
| LB-Medium (pH 7,5): | 10 g Trypton           |
|                     | 5 g Hefeextrakt        |
|                     | 5 g NaCl               |
|                     | 1 l ddH <sub>2</sub> O |

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| LB-Agarplatten: | 1 l LB-Medium |
|                 | 15 g Agar     |

### **2.8.3 Mini-Preparation von DNA aus bakteriellen Kulturen**

Von den Übernachtskulturen wurden 5 ml flüssiges LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/ml] mit einzelnen Kolonien mit Hilfe eines sterilen Holzstabs beimpft und wiederum über Nacht bei 37° C in einem Schüttler inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde am folgenden Tag mit einem kommerziellen DNA-Extraktionskit (QIAGEN Plasmid Mini Kit [Qiagen]) extrahiert.

### **2.8.4 Maxi-Preparation von DNA aus bakteriellen Kulturen**

Für eine höhere Ausbeute an DNA wurden 400 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/ml] mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und wiederum über Nacht bei 37° C in einem Schüttler inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde am folgenden Tag mit einem kommerziellen DNA-Extraktionskit (QIAGEN Plasmid Maxi Kit [Qiagen]) extrahiert.

### **2.8.5 Sequenzierung von rekombinierter DNA**

Die korrekte Sequenz der neuen Klone wurde durch Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977) mit einem kommerziellen Sequenzierungskit (T7 Sequenase DNA Sequencing Kit [Amersham Life Science]) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass nach Denaturierung und Anlagerung des Sequenzierungsprimers eine DNA-Polymerase-katalysierte Synthese des komplementären DNA-Stranges durch Einbau von zum Teil radioaktiven Desoxynukleotiden erfolgt. Zusätzlich befindet sich in der Reaktion aber

neben den Desoxynukleotiden noch eine kleine Menge eines Didesoxynukleotids. Wird nun ein Didesoxynukleotid anstelle eines Desoxynukleotids von der Polymerase in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut, kommt es zu einem irreversiblen Kettenabbruch.

Für die Sequenzierungsreaktion wurden 2-5 µg der Plasmid-DNA mit 5µl des *Plasmid Denaturing Reagents* und 1 µl (20 pmol) des Sequenzierungsprimers für 5 Min. in kochendem Wasser denaturiert. Danach wurde die Reaktion auf Eis gekühlt und 2 µl des *Plasmid Reaction Buffer* hinzugegeben. Zur Anlagerung des Primers wurde die Reaktion für 10 Min. bei 37° C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden vier Eppendorf Reaktionsgefäße mit den Buchstaben G,A,T und C beschriftet und mit 2.5 µl des entsprechenden Terminationsmixes befüllt und ebenfalls bei 37° C inkubiert. Das DNA-Primer-Gemisch wurde nun auf Eis inkubiert, und 2 µl des 1:4 verdünnten *Labeling Mix*, 1 µl DTT, 0.5 µl S<sup>35</sup> dATP und 2 µl T7-Sequenase dazu pipettiert. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei RT wurden jeweils 4.5 µl in die vier Terminationsgefäße pipettiert und danach nochmals für 5 Min. bei 37° C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 4 µl *Stop Solution* dazugegeben und die Proben bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei -20° C tiefgefroren.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie unter Kapitel 2.4.1.6 beschrieben. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte über Nacht bei RT.

|                       |                          |
|-----------------------|--------------------------|
| Sequenzierungs-Primer | 5'-CTAGAGGATAGAATGGCG-3' |
|-----------------------|--------------------------|

## 2.9 Transiente Transfektion von kultivierten C6-Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA, meist in Form von Plasmiden, in eukaryote Zellen. Die in dieser Arbeit benutzten C6-Zellen wurden transient mit Hilfe des FuGene 6-Transfektionsreagenzes (Boehringer Mannheim) transfiziert. Dazu wurden einen Tag vor der eigentlichen Transfektion ungefähr 200,000 Zellen in jede Vertiefung einer 6-well-Kulturplatte ausplatiert. Am folgenden Tag waren die Zellen dann ungefähr zu 50% Konfluenz gewachsen. Für die Transfektion wurden 3 µl des FuGene-Reagenzes mit 100 µl serumfreiem C6-Medium gemischt und für 5 Min. in einem sterilen Gefäß bei RT inkubiert. Danach wurde das

Medium mit dem Transfektionsreagenz langsam zu 1 µg der zu transfizierenden DNA pipettiert und wiederum für 15 Min. bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das alte Kulturmedium der C6-Zellen durch 900 µl frisches Medium ausgetauscht. Im Anschluss daran wurde die DNA mit dem Transfektionsreagenz tropfenweise zu den Zellen dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16 h im Kulturschrank waren die Zellen ungefähr zu 90% konfluent. Nun wurde das Transfektionsmedium nochmals durch frisches Medium ersetzt. Für eine Stimulation der Zellen mit zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde das Kulturmedium mit [1 mM] 8-Bromo-cAMP (Sigma) versetzt. Nach achtstündiger Inkubation erfolgte dann die Messung der Luciferaseaktivität des Zelllysats.

## 2.10 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay ist eine einfache Methode zur Analyse der relativen transkriptionellen Aktivität von Promotersequenzen. Die Zellen werden dazu mit einem chimären Konstrukt, bestehend aus dem zu untersuchenden Promoter und einem Luciferase-Gen, transfiziert. Das Luciferase-Gen kodiert für ein Enzym, das durch Oxidation von Luciferin Lichtquanten erzeugt. Dieses Phänomen wird als Biolumineszenz bezeichnet. Die Menge des emittierten Lichtes ist dabei direkt proportional zu der transkriptionellen Aktivität des Promoters.

Für die Durchführung des Luciferase-Assays wurde ein kommerzieller Kit (Luciferase Assay System [Promega]) benutzt. Zur Messung der Promoteraktivität der transfizierten C6-Zellen wurden zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl *Lysis Buffer* lysiert und mit Hilfe eines mitgelieferten Gummischabers zusammengekratzt. Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden 20 µl des Zelllysats mit 150 µl des *Luciferase Assay Reagent* gemischt und die Biolumineszenz in einem Luminometer (Monolight 1500, Analytical Luminescence Laboratory) für 10 Sek. gemessen. Jedes Transfektionsexperiment wurde in Triplikaten durchgeführt, und die gemessenen relativen Lichtwerte (*Relative Light Units*) wurde gemittelt.

## 2.11 Immunhistochemie

Immunhistochemie wurde an frisch gefrorenen Gewebsschnitten von foetalen Mäusen und adulten Rattengehirnen mit Antikörpern gegen humanes *Ku-70*, *Ku-80*, Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4 (Santa Cruz Biochemicals, Santa Cruz, CA) sowie rekombinantes P450scc (Black et al., 1993) durchgeführt.

### 2.11.1 Biotinylierung von Antikörpern

Da die Antikörper gegen P450scc und die Sp-Proteine in Hasen generiert wurden, war es für Ko-Lokalisationsexperimente nötig, einige der Antikörper zu biotinylieren, um so mehrere Antigen-Antikörperkomplexe auf einem Schnitt durch unterschiedliche Fluoreszenzfarben diskriminieren zu können. Zur Biotinylierung der Antikörper wurde ein kommerzieller Kit (FluoReporter Biotin-XX Protein Labeling Kit [Molecular Probes]) benutzt. Dazu wurden die Sp-Antikörper zunächst von 0.5 ml [200 mg/ml] auf ein Endvolumen von 0.2 ml [0.5 mg/ml] mittels eines *Spin columns* (Bio Rad) konzentriert. Anschließend wurden 20  $\mu$ l (1/10 [v/v]) einer [1 M] Natriumbikarbonatlösung unter ständigem Rühren dazugegeben. Danach wurden 2  $\mu$ l des zuvor in 200  $\mu$ l destilliertem Wasser resuspendierten *Biotin-XX sulfosuccinimidyl-ester* zu dem Antikörper dazugegeben. Die Reaktion wurde für 1.5 h gerührt, anschließend wurde das freie Biotin von dem Protein-gebundenen durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 1100 x g mit einer speziellen, vom Hersteller mitgelieferten Säule separiert.

### 2.11.2 Sektionierung und Fixierung des Gewebes

Die für die Immunhistochemie benutzten ganzen Rattenembryos und adulten Rattengehirne wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. und mit einem Kryotom in 10  $\mu$ m dünne Schichten geschnitten. Die Schnitte wurden dann auf Objektträger gebracht und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70° C tiefgefroren. Für die Immunfärbungen wurden die Schnitte für 20 Min. bei RT in 4%-iger Paraformaldehydlösung fixiert, danach dreimal für fünf Min. mit PBS gewaschen

und anschließend mit PBS, das 10% FCS und 0.3% Triton X-100 (Sigma) enthielt, geblockt.

### **2.11.3 Immunfärbung mit P450scc-Antikörper ...**

Die fixierten und geblockten Schnitte wurden zunächst mit dem primären, 1:500 verdünnten Antikörper gegen P450scc für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgte ein zweiter 30-minütiger Inkubationsschritt mit dem sekundären, 1:200 verdünnten *Anti-Rabbit-FITC*-Antikörper. Der Antikörperüberschuss wurde wieder durch dreimaliges Waschen entfernt.

#### **2.11.3.1 ... und Antikörpern gegen die beiden *Ku*-Untereinheiten**

Für Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen P450scc und *Ku* wurden die Schnitte wiederum für 2 h mit primärem, 1:500 verdünntem Antikörper gegen *Ku* inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte zuletzt für 30 Min. mit sekundärem, 1:200 verdünntem *Anti-Goat-Rhodamine*-Antikörper inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde im Anschluß wieder durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Schnitte mit einer Mischung aus 50% PBS und 50% Glycerin bedeckt.

#### **2.11.3.2 ... und Antikörpern gegen Sp-Proteine**

Für Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen P450scc und Sp-Proteine wurden die Schnitte zunächst für 1 h mit 10% *Rabbit Serum* inkubiert, um den sekundären *Anti Rabbit-FITC* Antikörper aus der ersten Färbung vollständig zu blockieren. Nun wurden die Schnitte für 2 h mit primärem, 1:100 verdünntem Antikörper gegen eines der Sp-Proteine inkubiert. Im Anschluß wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und für 30 Minuten mit Extravidin-Texas-Rot (Sigma) in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Das überschüssige Extravidin-Texas-Rot wurde ebenfalls durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Schnitte mit einer Mischung aus 50% PBS und 50% Glycerin bedeckt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die -130/-94 Region des P450scc-Promoters

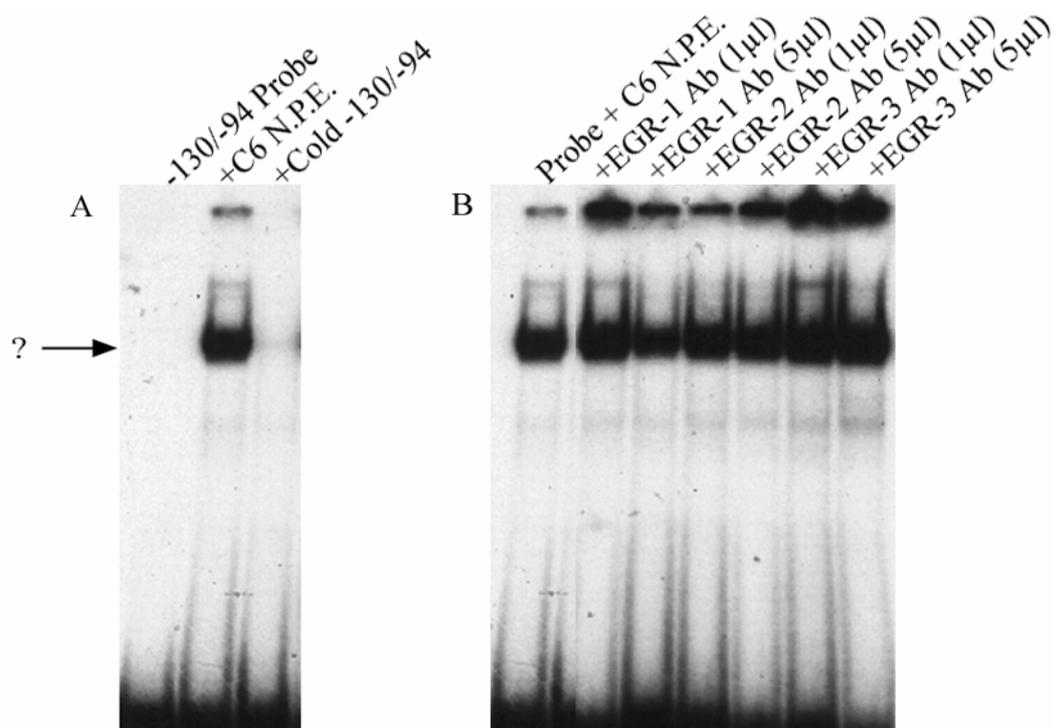
In zuvor durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass das CYP11a1-Gen der Ratte in der glialen C6-Zelllinie exprimiert wird (Mellon und Deschepper, 1993). In Transfektionsexperimenten in C6-Zellen zeigte sich, dass sich das für die Regulation der Transkription erste wichtige Element im Bereich -130/-94 des Promoters befindet (Zhang et al., 1995).

Gelretentionsanalysen der -130/-94 Region des Ratten P450scc-Promoters mit nukleärem C6-Extrakt zeigten, dass diese Region von einem einzelnen Protein gebunden wird. Die Bindung dieses Proteins war darüber hinaus sequenzspezifisch, da ein fünfhundertfacher molarer Überschuss an nicht markiertem Oligonukleotid die Bindung kompetitiv verdrängte (Abbildung 7A). Eine Sequenzanalyse dieses Bereichs zeigte einen an den Basen Guanin (G) und Cytosin (C) reichen DNA-Abschnitt, der eine große Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz der Sp- wie auch der EGR-Transkriptionsfaktoren aufweist (Tabelle 2).

|                      |                |                             |
|----------------------|----------------|-----------------------------|
| -130/-94 Sequenz     | GGGCGGGGC      |                             |
| Sp Konsensussequenz  | (G/T)GGGCGGGGC | (Kadonaga et al., 1987)     |
| EGR Konsensussequenz | GCG(G/T)GGGCG  | (Christy und Nathans, 1989) |

**Tabelle 2** Vergleich der -130/-94 Region mit Sp-/EGR-Konsensussequenzen  
Sequenzvergleich der GC-reichen Region bei -130/-94 des P450scc-Promoters und den Konsensussequenzen von Mitgliedern der Sp- und EGR-Familie

In zuvor durchgeführten Gelretentionsanalysen zur Identifizierung des DNA-bindenden Proteins zeigte sich, dass Sp1 nicht das Protein war, das in diesem Assay an die -130/-94 Region des P450scc-Promoters band (Zhang et al., 1995); unklar war jedoch, ob eventuell eines der EGR-Familienmitglieder für diese Bande verantwortlich sein könnte. Aus diesem Grund wurden Gelretentionsanalysen mit Antikörpern gegen



**Abbildung 7** Gelretentionsanalyse der -130/-94 Region mit C6-Proteinextrakt

**A** Autoradiographie einer Inkubation von C6-Extrakt und markiertem -130/-94 Oligonukleotid. Die Spur -130/-94 Probe enthält ausschließlich Sonde, +C6 N.P.E. enthält Sonde und Proteinextrakt, +Cold -130/-94 enthält Sonde, C6-Extrakt und einen 500 molaren Überschuss an kaltem Oligonukleotid. **B** Die Spur Probe +C6 N.P.E. enthält Sonde und C6-Extrakt, +EGR enthält Sonde, Extrakt und verschiedene Konzentrationen von EGR-Antikörpern.

die EGR-Proteine (EGR 1-3) durchgeführt. Hierbei zeigte sich jedoch weder ein *Supershift* noch eine Depletion der Bande, was eine Beteiligung eines der drei EGR-Proteine an diesem DNA:Protein-Komplex unwahrscheinlich erscheinen lässt (Abbildung 7B).

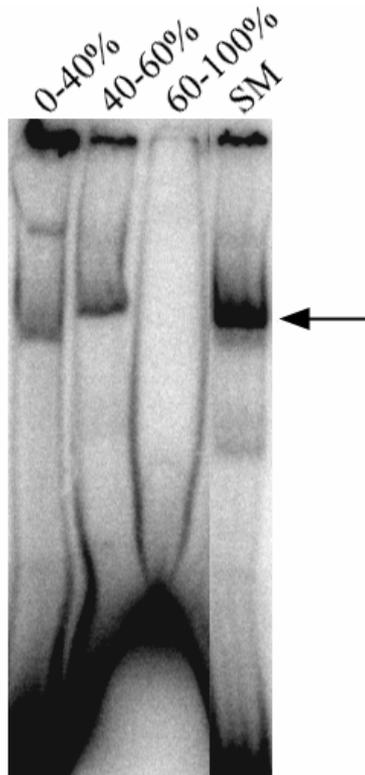
### 3.1.1 Biochemische Aufreinigung des DNA-bindenden C6-Proteins

Zur Identifizierung des DNA-bindenden Proteins wurde nun eine biochemische Aufreinigung durchgeführt. Für diesen Aufreinigungsprozess wird initial eine große Gesamtproteinmenge benötigt, um nach dem Aufreinigungsprozess ausreichend aufgereinigtes Protein zur Verfügung zu haben. Zur Gewinnung großer Zell- und damit Gesamtproteinmengen wurden die C6-Zellen daher in 20 rotierenden Kulturflaschen (*Roller bottles*) kultiviert. Nachdem die C6-Zellen zu ~ 80% konfluent waren, wurden die Zellen geerntet und die nukleären Proteine extrahiert (2.2).

### 3.1.1.1 Ammoniumsulfat-Präzipitation

Der nächste Aufreinigungsschritt bestand in einer Präzipitation der nukleären Proteine mit verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen (2.5). Das Vorhandensein des aufzureinigenden Proteins wurde durch eine Gelretentionsanalyse der einzelnen Präzipitationsfraktionen vollzogen. Hierbei zeigte sich, dass das gesuchte Protein überwiegend bei einer Ammoniumsulfatsättigung von 40-60% präzipitierte (Abbildung 8), weshalb diese Fraktion als Ausgangsmaterial für den nächsten Aufreinigungsschritt verwendet wurde.

---



---

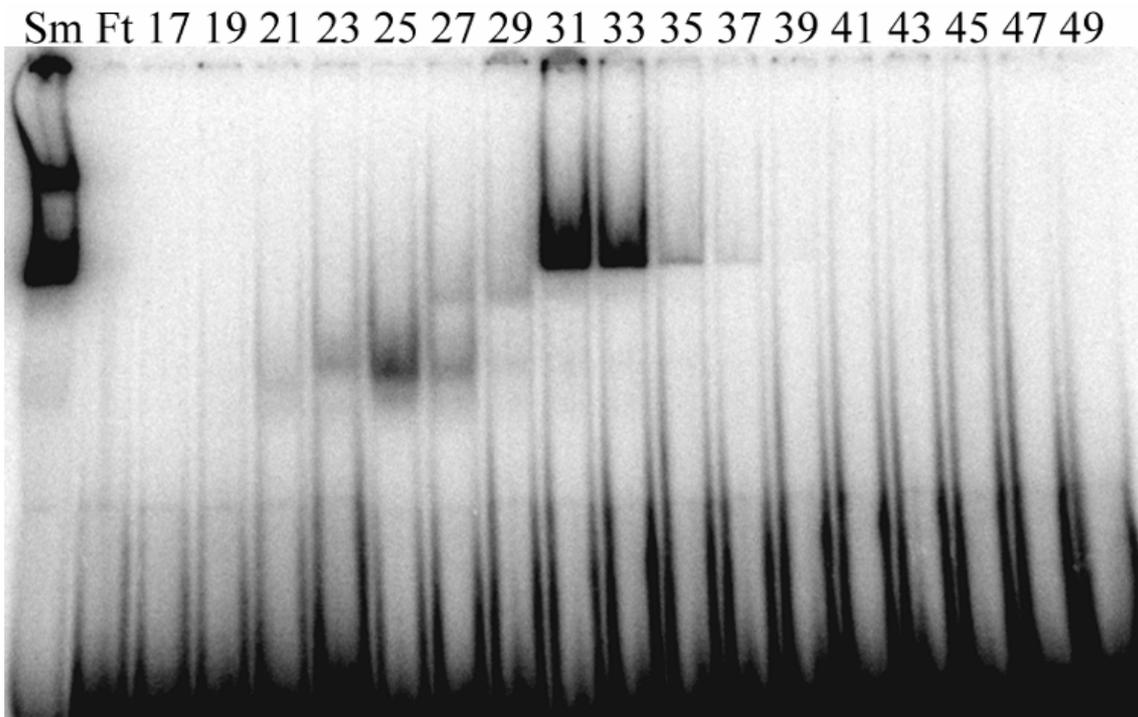
**Abbildung 8** Gelretentionsanalyse der Ammoniumsulfatfraktionen  
Autoradiographie einer Inkubation von C6-Extrakt und markiertem -130/-94 Oligonukleotid. Die Spur *Sm* enthält das Startmaterial der Ammoniumsulfatpräzipitation und Sonde, Spur *0-40%*, *40%-60%* und *60-100%* enthalten Sonde und die jeweils bei dieser Ammoniumsulfatkonzentration präzipitierten Proteine. Der Pfeil markiert das aufzureinigende Protein.

---

### 3.1.1.2 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die 40-60%-Ammoniumsulfatfraktion wurde nun zunächst dialysiert und danach weiter mit Hilfe einer Anionenaustauschsäule aufgereinigt. Dazu wurde die

Säule mit der dialysierten 40-60%-Fraktion der Ammoniumsulfatpräzipitation beladen und anschließend die Proteine schrittweise durch einen linear ansteigenden Natriumchloridgradienten von der Säule gewaschen (2.6). Die hierbei gewonnenen Fraktionen wurden wieder mit Hilfe der Gelretentionsanalyse auf Präsenz des aufzureinigenden Proteins analysiert (Abbildung 9). Hierbei stellte sich heraus, dass das Protein vollständig von der Säulenmatrix gebunden wurde, da keine Bindungsaktivität im Durchfluss (*Flow Through*) detektiert werden konnte. Eine Analyse der eluierten Fraktionen zeigte das aufzureinigende Protein in den Fraktionen #31-38. Unerwarteterweise zeigte sich in den Fraktionen #25-28 ein weiteres, die -130/-94 Sequenz bindendes Protein.



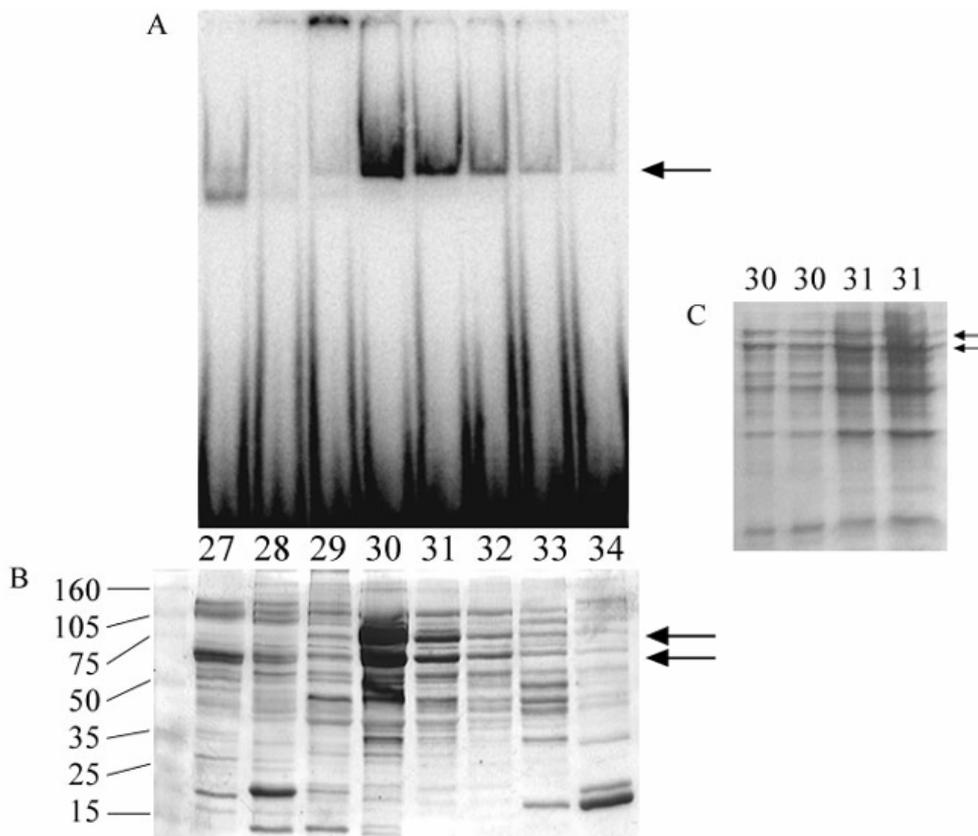
---

**Abbildung 9** Gelretentionsanalyse der Mono-Q-Fractionen  
Autoradiographie einer Inkubation der Mono-Q-Fractionen mit markiertem -130/-94 Oligonukleotid. Die Spur *Sm* enthält das Startmaterial der Chromatographie, *Ft* enthält die nicht an die Säule gebundenen Proteine (*Flow through*), die anderen Spuren enthalten ein Aliquot des Eluats zweier Fraktionen.

---

Zur differentiellen Analyse der die Bindungsaktivität enthaltenden Mono-Q-Fractionen #27-34 wurden kleine Mengen dieser Fraktionen durch Elektrophorese aufgetrennt und die einzelnen Proteine durch Silberimprägnierung angefärbt (Abbildung 10A). Hierbei zeigten sich zwei Proteinbanden von jeweils ~ 70 und 80 kDa, die in den

Mono-Q-Fractionen mit DNA-Bindungsaktivität besonders angereichert waren. Darüber hinaus schien das Intensitätsmuster in der Silberimprägnierung (Abbildung 10A), das die absolute Menge dieser Proteine in der jeweiligen Fraktion repräsentiert, exakt mit dem Muster des Protein:DNA-Komplexes in der Gelretentionsanalyse (Abbildung 10B) übereinzustimmen. Die Übereinstimmung in den beiden Assays deutete darauf hin, dass es sich bei einem dieser beiden Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit um das gesuchte Protein, das in der Gelretentionsanalyse an die -130/-94 Region des P450<sub>scc</sub>-Promoters bindet, handeln könnte.



**Abbildung 10** Analyse der Mono-Q-Fractionen #27-34

**A** Gelretentionsanalyse der Mono-Q-Fractionen #27-34. Die Spuren #27-34 enthalten markiertes -130/-94 Oligonukleotid und Proteine der entsprechenden Mono-Q-Fraktion. **B** Silberimprägnierung der durch PAGE aufgetrennten Mono-Q-Fractionen. **C** Coomassie Färbung der durch PAGE aufgetrennten Mono-Q-Fractionen #30, 31.

Zur Aminosäureanalyse wurden die Fractionen #30 und #31 mit der größten Menge der beiden Proteine in jeweils zwei Taschen eines Gels geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert

(2.7.2.2). Nach kurzem Anfärben der Membran wurden die beiden Banden ausgeschnitten und anschließend nach der Edman-Degradierungsmethode ansequenziert (Abbildung 10C).

### 3.1.1.3 Der *Ku*-Komplex bindet an die -130/-94 Region

Das Ansequenzieren der beiden Proteine ergab eine gut lesbare, 19 Aminosäuren lange Sequenz für das ~ 80 kDa schwere Protein; das Protein von ~ 70 kDa war chemisch blockiert und konnte aus diesem Grund nicht ansequenziert werden. Die für das größere Protein erhaltene Sequenz wurde daraufhin in *Blast Protein Search* und mit sämtlichen in der Datenbank vorhandenen Sequenzen verglichen. Die *Blast*-Analyse ergab eine hundertprozentige Identität der unbekanntes Proteinsequenz mit der 86 kDa großen Untereinheit des *Ku*-Proteinkomplexes (Tabelle 3).

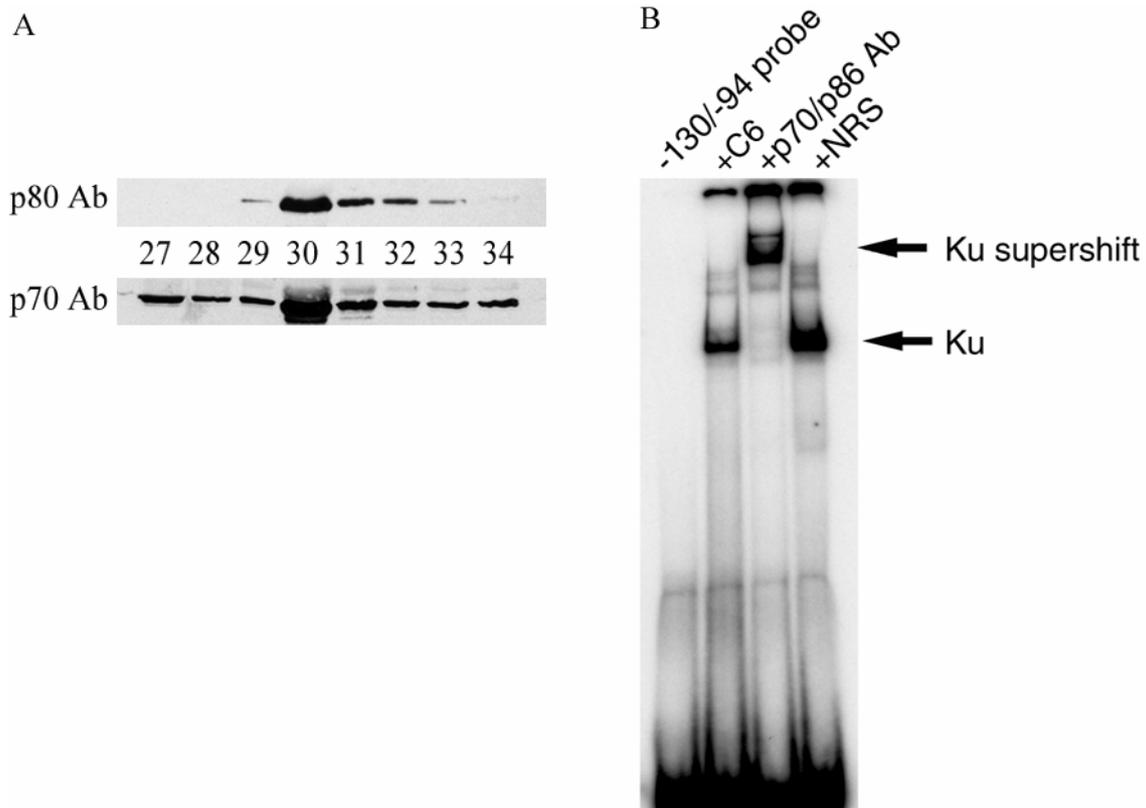
|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| Sequenz des aufgereinigten Proteins       | <b>VRSGNKAADVVL(Y/C)MDVGFTM</b> |
| Human <i>Ku</i> 86 (Protein Blast search) | <b>VRSGNKAADVVL C MDVGFTM</b>   |

**Tabelle 3** Blastanalyse des ansequenzierten Proteins  
Vergleich der Aminosäuresequenz des ansequenzierten ~ 80 kDa Proteins mit dem Ergebnis der Blast-Analyse.

Der *Ku*-Komplex besteht aus zwei Untereinheiten p70 und p80, die nach Ausbildung eines Heterodimers an DNA binden. Um sicher zu sein, dass es sich bei dem DNA-bindenden Protein der Fraktionen #30-34 tatsächlich um den *Ku*-Komplex handelt, wurden mit Antikörpern gegen p70 und p80 weitere Gelretentionsanalysen und Western-Blots durchgeführt.

In Western-Blots der Fraktionen #30-34 mit Antikörpern gegen p70 und p80 zeigte sich, dass in diesen Fraktionen wie erwartet die beiden *Ku*-Untereinheiten angereichert waren. Weiterhin entsprach die Bandenintensität im Western-Blot dem Muster, das zuvor in der Gelretentionsanalyse und Silberfärbung beobachtet wurde (Abbildung 11A, B). In der Gelretentionsanalyse der Fraktion #30 mit der -130/-94 Sonde war es möglich, sowohl durch Zugabe des gegen p70 als auch des gegen p80 gerichteten Antikörpers einen *Supershift* des Protein:DNA-Komplex zu erzeugen (Abbildung 11B), wodurch das DNA-bindende Protein eindeutig als *Ku*-Komplex identifiziert werden konnte. Offensichtlich liegen die beiden Untereinheiten auch ohne

Bindung an DNA als Heterodimer vor, weshalb eine DNA-unabhängige Aufreinigung der Untereinheiten gelingen konnte. Weiterhin erklärt sich durch dieses Ergebnis auch die Identität der zweiten ausgeschnittenen Bande, deren Sequenzierung aus technischen Gründen nicht gelang. Hierbei handelt sich um die kleine Untereinheit (p70) des *Ku*-Komplexes.



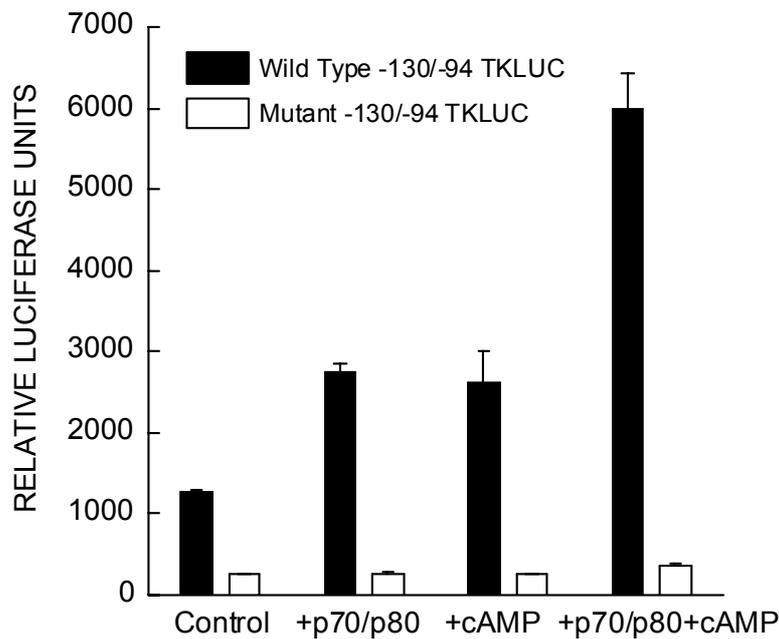
**Abbildung 11** Der *Ku*-Komplex bindet an die -130/-94 Region  
**A** Western-Blot-Analyse der Mono-Q-Fractionen #27-34 mit Antikörpern gegen die p70- und p80-Untereinheit des *Ku*-Komplexes. **B** Gelretentionsanalyse von nukleären C6-Proteinen und markiertem -130/-94 Oligonukleotid. Die Spur -130/-94 probe enthält Sonde, +C6 enthält Sonde und C6-Extrakt, +p70/p86 Ab enthält Sonde, Extrakt und Antikörper gegen den *Ku*-Komplex, +NRS enthält Sonde, Extrakt und Hasen-Serum vor Immunisierung (*non immune rabbit serum*).

#### 3.1.1.4 Transkriptionelle Aktivierung von CYP11a1 durch *Ku*

Als Nächstes wurde untersucht, ob *Ku* tatsächlich die Transkription des P450scc-Gens beeinflussen kann. Dazu wurden die C6-Zellen mit einem zuvor klonierten -130/-94 P450scc-Luciferasekonstrukt (Zhang et al., 1995) und zwei eukaryotischen Expressionsvektoren für die beiden Untereinheiten p70 und p80 (Reeves

und Sthoeger, 1989) transfiziert. Das Luciferase-Reporterkonstrukt bestand entweder aus der Wildtypsequenz oder einer Mutanten der -130/-94 Region des P450scc-Promoters, der vor einen Thymidinkinasepromoter und ein Luciferase-Reporter gen kloniert wurde.

Die Transfektionsdaten zeigten, dass eine Ko-Transfektion der beiden *Ku*-Untereinheiten zwar das Reporterkonstrukt mit der Wildtypsequenz, nicht aber das Konstrukt mit einer Mutation innerhalb der *Ku*-Bindungssequenz transaktivieren kann (Abbildung 12). Eine Behandlung der Zellen mit cAMP veränderte nicht die relative Promoteraktivität, was darauf hindeutet, dass *Ku* offensichtlich ausschließlich an der basalen Aktivierung des P450scc-Promoters, nicht aber an einer cAMP vermittelten Induktion beteiligt ist. Die Transfektionsdaten belegen, dass *Ku* an die -130/-94 Region des P450scc-Promoters bindet und darüber hinaus in C6-Zellen die Transkription des P450scc-Promoters aktivieren kann.

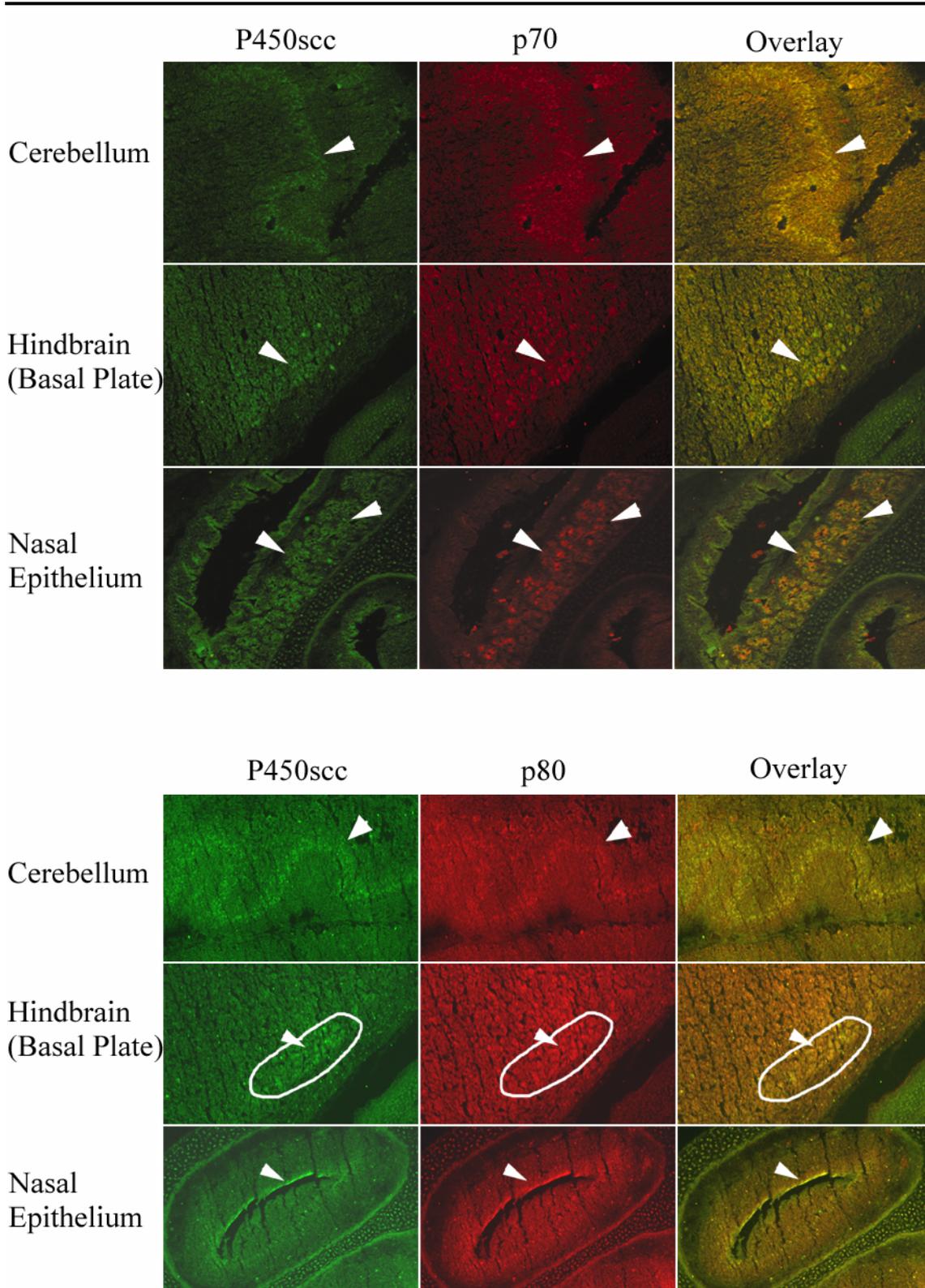


**Abbildung 12** *Ku* transaktiviert den P450scc-Promoter

Ko-Transfektion des -130/-94rP450scc-TkLuc-Reporterplasmids mit zwei eukaryotischen Expressionsvektoren der beiden *Ku*-Untereinheiten in C6-Zellen. Die Luciferaseaktivität wurde 6h nach Behandlung mit cAMP oder ohne die Zugabe von cAMP gemessen. Die gemessene relative Luciferaseaktivität (RLU) entspricht dem Mittelwert +/- SD dreier Transfektionsexperimente.

### 3.1.1.5 Ko-Lokalisation von P450scc und *Ku* im Nervensystem

Aufgrund der Bindungs- und Transfektionsdaten stellte sich die Frage, ob sich die beiden *Ku*-Untereinheiten tatsächlich auch *in vivo* in denselben Zellen des Nervensystems wie das P450scc-Enzym befinden. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen an 18.5 Tage alten Mäuseembryonen durchgeführt. Eine Analyse der Gehirnregionen, in denen schon in früheren Studien das P450scc-Enzym gefunden wurde (Compagnone et al., 1995a), zeigte, dass in der Tat die beiden *Ku*-Untereinheiten in vielen dieser Bereiche mit dem P450scc-Enzym ko-exprimiert werden. Zur Darstellung der Ko-Expression für entweder die kleine Untereinheit (p70) oder die große Untereinheit (p80) von *Ku* mit P450scc wurden immunhistochemische Doppelfärbungen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Ko-Lokalisation von p80 und P450scc im *Bulbus olfactorius* (Daten nicht gezeigt), in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns, in den Drüsenzellen der Nasenschleimhaut und in den Motoneuronen der Basalplatte des Hinterhirns und des Rückenmarks von E18.5 alten Mäuseembryonen (Abbildung 13A). In denselben Regionen war ebenfalls die kleine Untereinheit, p70, mit P450scc ko-lokalisiert (Abbildung 13B). In der Epithelschicht der Nasenschleimhaut hingegen fand sich ausschließlich eine Ko-Lokalisation von p70 mit P450scc, nicht aber von p80 mit P450scc. Allgemein lässt sich feststellen, dass die p80-Untereinheit in mehr Regionen des ZNS exprimiert wird als die p70-Untereinheit und P450scc. In immunhistochemischen Färbungen an jüngeren Mäuseembryonen konnte keine Ko-Lokalisation der beiden *Ku*-Untereinheiten mit P450scc gefunden werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 13** Ko-Lokalisation von P450scc und *Ku* in E18.5 Mäusembryonen  
 Immunhistochemische Färbung von P450scc und den *Ku*-Untereinheiten im Bereich des Kleinhirns, der Basalplatte und des Nasenepithels. **A** Immunhistochemische Färbung gegen P450scc kommt in Grün, gegen p70 in Rot und überlappende Bereiche (*Overlay*) kommen in Gelb zur Darstellung. **B** Immunhistochemische Färbung gegen P450scc (Grün) und p80 (Rot).

### 3.1.1.6 Zusätzliche C6-Proteine binden an die -130/-94 Region

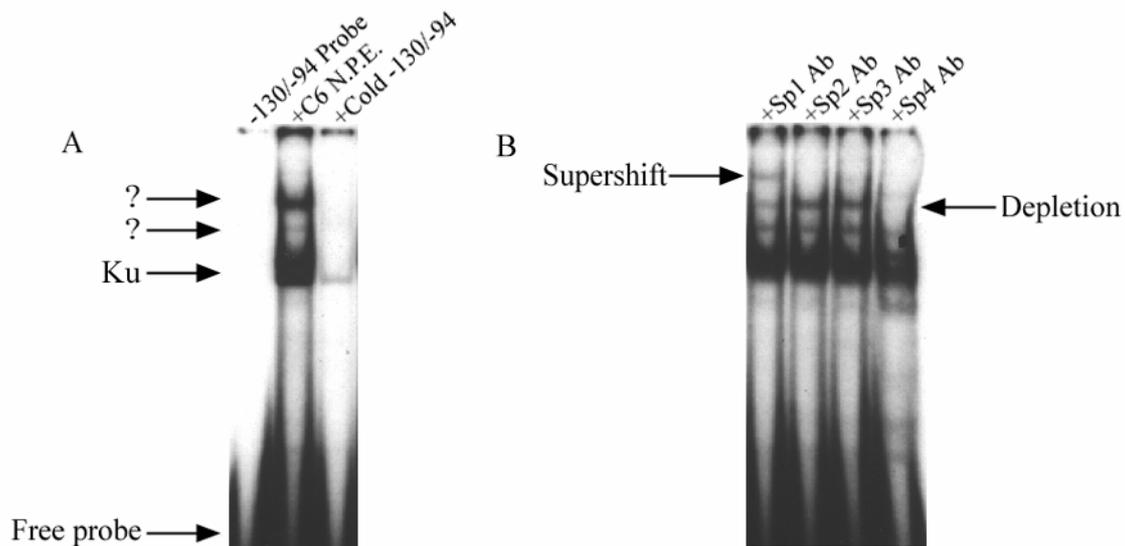
Da die beiden *Ku*-Untereinheiten in einem hohen Maß in den C6-Zellen exprimiert werden, wurde das Protokoll für die Gelretentionsanalyse modifiziert, so dass nur noch eine kleine Menge von *Ku* an die DNA-Sonde binden konnte. Dies wurde erreicht, indem der C6-Extrakt zunächst mit polydI\*dC inkubiert wurde, bevor anschließend die DNA-Sonde dazugegeben wurde (2.3.1.4).

Das Ergebnis war verblüffend, da plötzlich zwei neue, ebenfalls sequenzspezifische Protein:DNA-Komplexe detektiert werden konnten (Abbildung 14A). Die Tatsache, dass diese neuen Protein:DNA-Komplexe vorher nicht detektiert wurden, deutet darauf hin, dass *Ku* sehr stark an die DNA-Sonde bindet, wodurch Bindungen anderer Proteine an die Sonde offensichtlich verdrängt werden.

### 3.1.1.7 Mitglieder der Sp-Familie binden an die -130/-94 Region

Wie zuvor erwähnt, ähnelt die GC-reiche -130/-94 Region der Konsensus-Bindungssequenz von Sp- und EGR-Transkriptionsfaktoren (Tabelle 2). Zur Identifizierung der neu entdeckten DNA-bindenden Proteine wurden daher wieder Gelretentionsanalysen mit Antikörpern gegen Mitglieder der Sp- und EGR-Proteine durchgeführt.

Die Zugabe von Antikörpern gegen EGR 1,2 und 3 zeigte auch diesmal wieder keine Reaktivität mit einem der neuen Komplexe (Daten nicht gezeigt). Nach Zugabe des Antikörpers gegen Sp1 konnte ein Supershift des einen neuen Komplexes (Abbildung 14B), nach Zugabe des Antikörpers gegen Sp4 eine Depletion eines anderen Komplexes erzielt werden. Antikörper gegen Sp2 und Sp3 hingegen zeigten keine Reaktivität mit einem der Protein:DNA-Komplexe. Diese Daten belegen, dass neben *Ku* noch andere Proteine der C6-Zellen, nämlich Sp1 und Sp4, sequenzspezifisch an die -130/-94 Region des P450<sub>scc</sub>-Promoters binden können. Die Tatsache, dass sich nach Zugabe von Antikörpern gegen Sp2 und Sp3 keine Veränderungen zeigen, deutet am ehesten darauf hin, dass diese beiden Proteine in C6-Zellen nicht exprimiert werden, da die DNA-Bindungssequenz aller Sp-Proteine, aufgrund sehr grosser Homologien in den DNA-Bindungsdomänen, praktisch identisch ist.



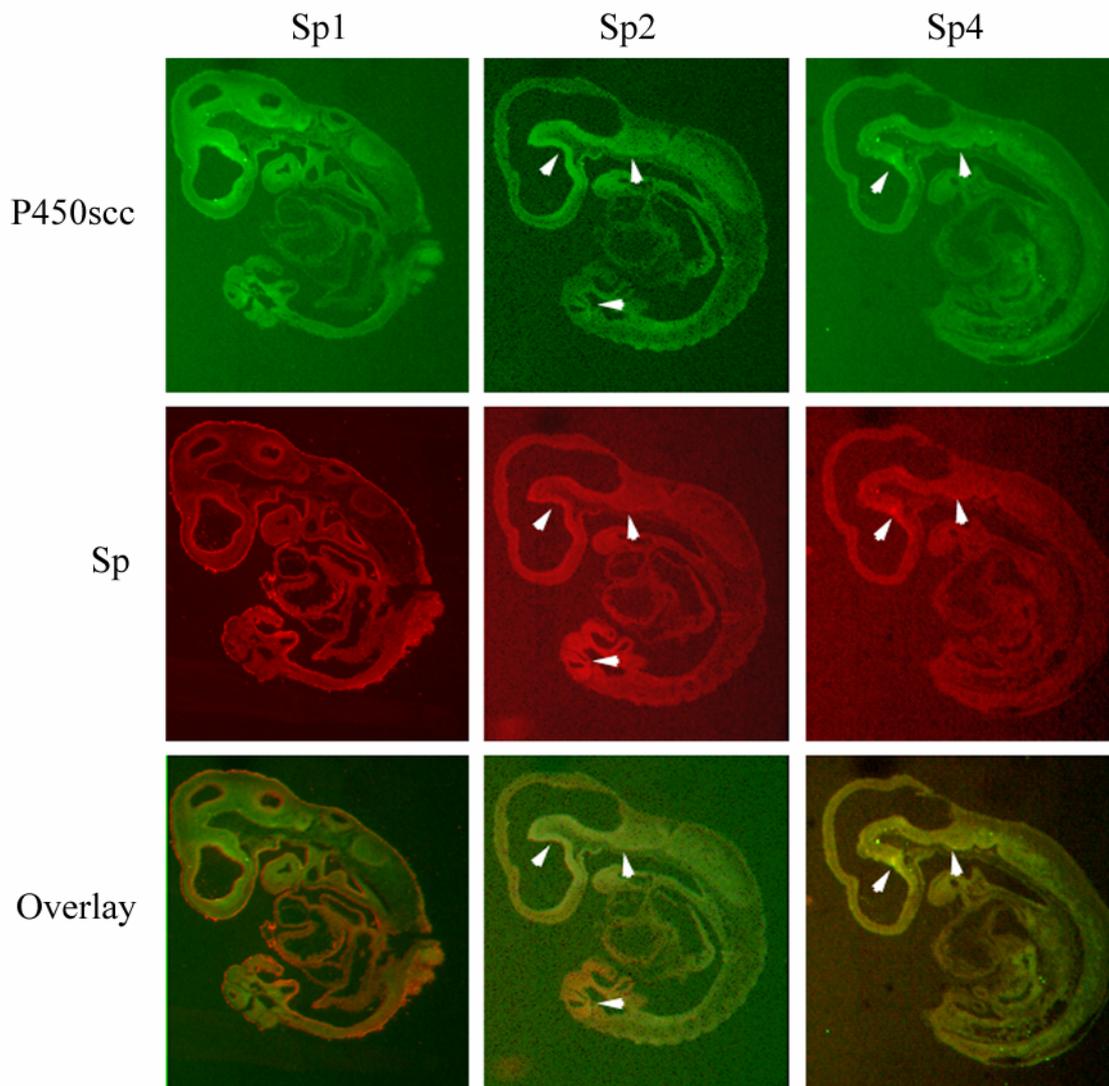
**Abbildung 14** Weitere C6-Proteine binden ebenfalls an die -130/-94 Region

Gelretentionsanalyse eines nukleären Proteinextraktes mit -130/-94 Sonde. **A** Spur -130/-94 enthält nur Sonde, +C6 N.P.E. enthält C6-Extrakt und Sonde, und +Cold -130/-94 enthält Extrakt, Sonde und einen 500 molaren Überschuss an kaltem -130/-94 Oligonukleotid. **B** Die Spuren enthalten Sonde, C6-Extrakt und entsprechend der Beschriftung Antikörper gegen Sp-Proteine. Der Pfeil *Supershift* markiert die Retardation eines Komplexes mit Sp1-Antikörpern, der Pfeil *Depletion* markiert die Auflösung eines Komplexes.

### 3.1.1.8 Ko-Lokalisation von Sp-Proteinen und P450scc

Die Ergebnisse der Gelretentionsanalyse deuteten darauf hin, dass möglicherweise neben dem *Ku*-Komplex auch Sp-Proteine an der transkriptionellen Regulation von P450scc beteiligt sein könnten. Aus diesem Grund wurden Schnitte von Mäuseembryonen verschiedenen Alters mittels immunhistochemischer Färbungen auf Ko-Lokalisation von P450scc mit den Sp-Proteinen untersucht.

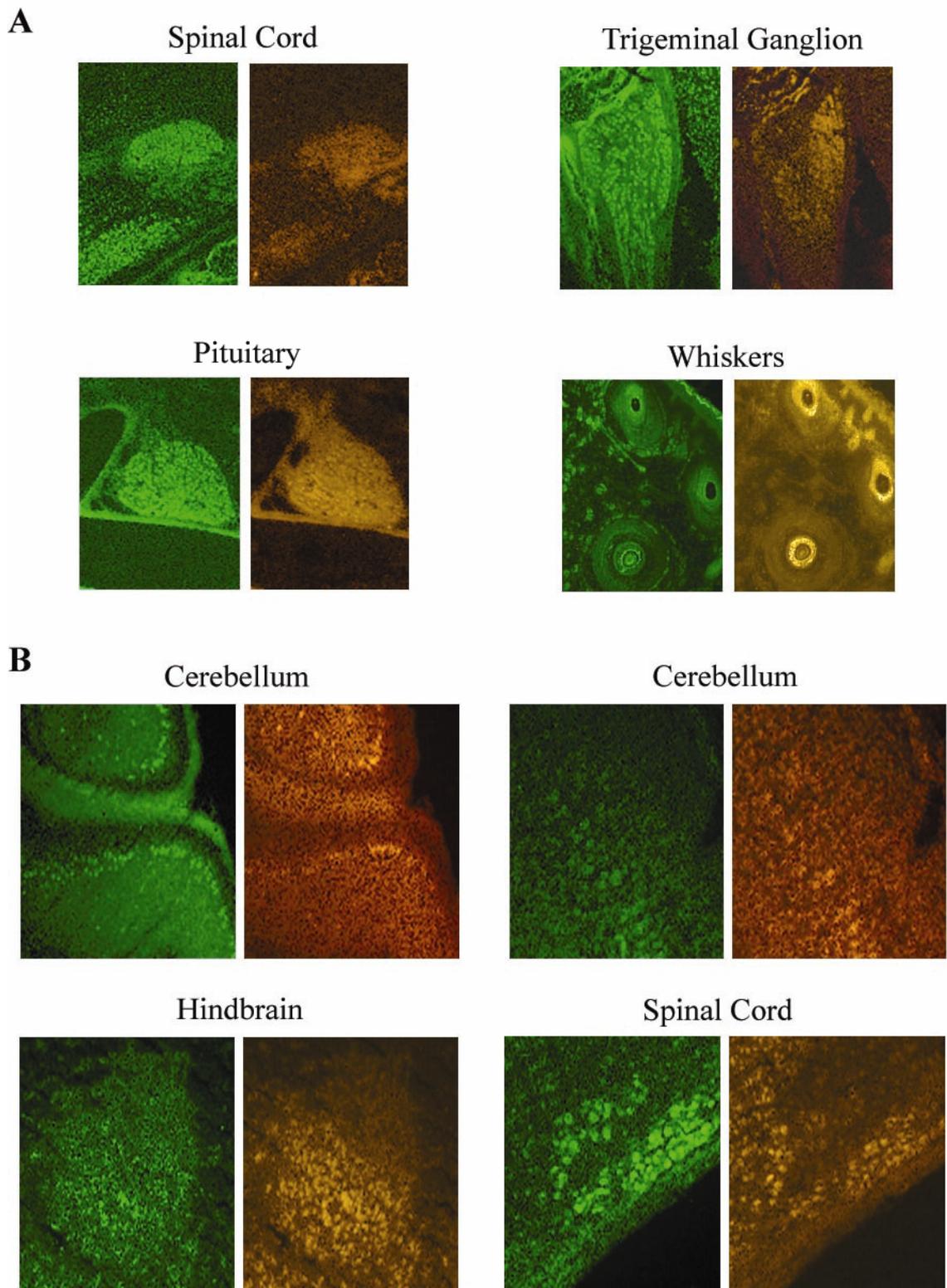
Zum Zeitpunkt E9.5 findet sich eine Ko-Lokalisation von Sp2 und Sp4 mit P450scc im ventralen Neuroektoderm (Abbildung 15, mittlere und rechte Spalte). Ko-Lokalisation von Sp4 und P450scc findet sich im Bereich der Rathke-Tasche (rechte Spalte), von Sp2 und P450scc im Bereich des ventralen Neuralrohres (mittlere Spalte) und von Sp4 und P450scc in Zellen der Neuralleiste. Zum Zeitpunkt E9.5 konnte keine Ko-Lokalisation von Sp1 und P450scc gefunden werden. Es lässt sich somit festhalten, dass zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt Sp2 und Sp4, nicht jedoch Sp1, an der Aktivierung des CYP11a1-Gens beteiligt sein könnten.



**Abbildung 15** Expression von P450scc und Sp-Proteinen in Mäuseembryonen  
 Immunhistochemische Färbung von P450scc und Sp-Proteinen an E9.5 alten Mäuseembryonen. Immunhistochemische Färbung gegen P450scc kommt in der obersten Zeile in Grün, gegen Sp-Proteine in der mittleren Zeile in Rot und der *Overlay* in der untersten Zeile in Gelb zur Darstellung.

Sowohl bei E18.5 alten Embryonen als auch bei neun Tage alten Mäusebabys fanden sich hingegen einige Regionen, in denen Sp1 und P450scc ko-lokalisiert waren. Hierbei handelte es sich um Zellen des Rückenmarks, des *Ganglion trigeminale*, der Hypophyse und der Schnurrbarthaare (Abbildung 16A).

Bei neun Tage alten Mäusen findet sich weiterhin eine Ko-Lokalisation von Sp1 und P450scc im Bereich der Purkinje-Zellen des Kleinhirns, in einem Kerngebiet des Nachhirns und in den Motoneuronen des ventralen Rückenmarks (Abbildung 16B).



**Abbildung 16** Ko-Lokalisation von P450scc und Sp1  
 Immunhistochemische Doppelfärbungen gegen P450scc (Grün) und Sp1 (Rot). **A** Ko-Lokalisation von P450scc und Sp1 in E18.5 alten Mäuseembryonen im Bereich des Rückenmarks (*Spinal Cord*), des *Ganglion trigeminale*, der Hypophyse (*Pituitary*) und der Schnurrbarthaare (*Whiskers*). **B** Ko-Lokalisation von P450scc und Sp1 in neun Tage alten Mäusebabys im Bereich des Kleinhirns (*Cerebellum*), des Nachhirns (*Hindbrain*) und des Rückenmarks.

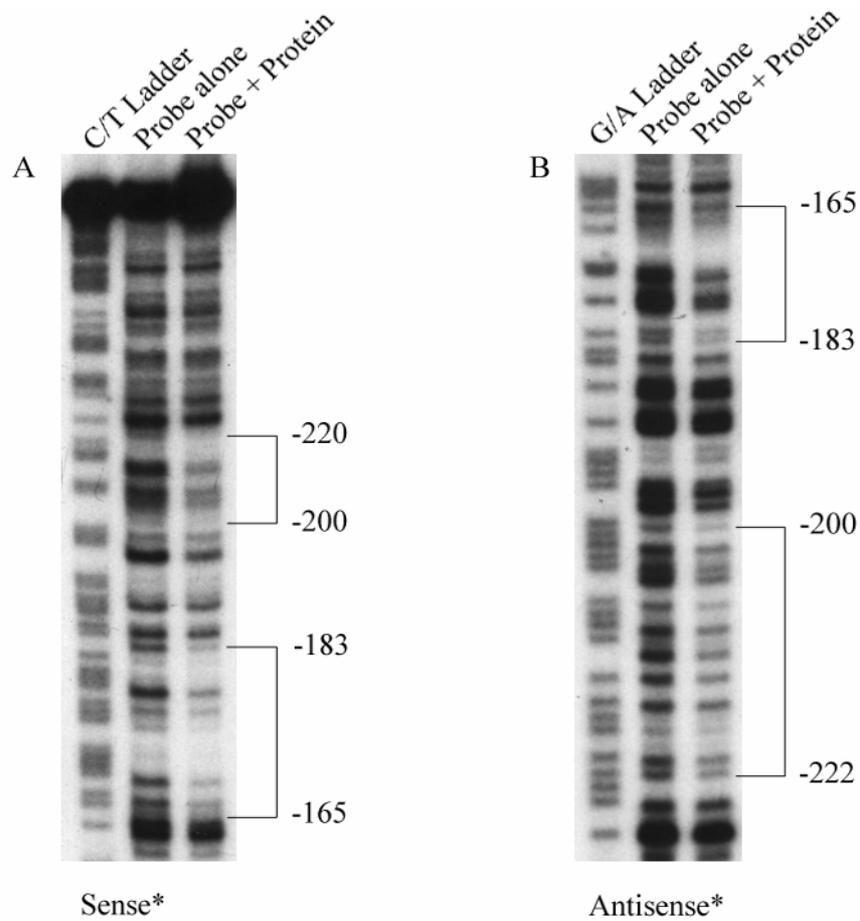
## 3.2 Die -230/-130 Region des P450<sub>scc</sub>-Promoters

Zuvor in C6-Zellen durchgeführte Transfektionsexperimente mit unterschiedlich langen Deletionen des P450<sub>scc</sub>-Promoters ließen vermuten, dass sich neben dem -130/-94 Element noch weitere regulative DNA-Sequenzen im Bereich -230/-130 befinden, die zur basalen Aktivierung des P450<sub>scc</sub>-Promoters beitragen (Zhang et al., 1995). Unklar war jedoch, durch welche DNA-Motive und durch welche an diese Motive bindende Transkriptionsfaktoren innerhalb dieses 100 bp langen Promoterabschnitts diese Aktivierung erfolgte. Zur Eingrenzung dieser Regionen wurde ein DNase I *Footprinting Assay* durchgeführt.

### 3.2.1 Analyse der -230/-130 Region mit DNase I *Footprinting*

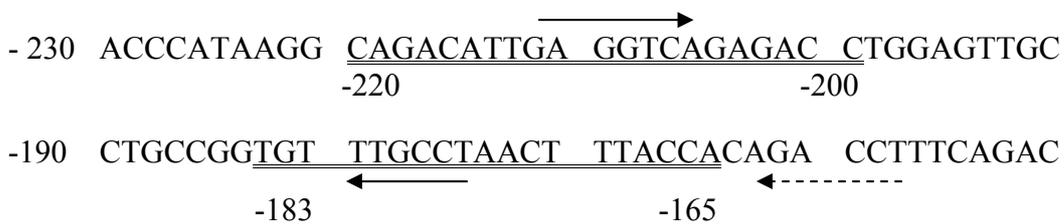
Nach Inkubation eines radioaktiv markierten DNA-Doppelstranges des -230/-130 Bereichs mit einem Extrakt von C6-Proteinen und einem Verdau mit DNase I, erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der gewonnenen Fragmente (2.4). Hier zeigten sich zwei Regionen innerhalb des -230/-130 Bereichs, die in Anwesenheit von C6-Proteinen weniger verdaut wurden als in Abwesenheit von C6-Proteinen (Abbildung 17A). Dieser reduzierte Verdau ist ein Hinweis darauf, dass diese beiden Elemente von C6-Proteinen gebunden und dadurch vor dem Verdau durch DNase I geschützt werden. In einem Kontrollexperiment zeigte sich nach radioaktiver Markierung des gegenläufigen Stranges wie erwartet dasselbe Bild (Abbildung 17B). Die genaue Lokalisation der beiden *Footprints* entsprach dem Bereich zwischen -200/-200 und -183/-165 des CYP11a1-Promoters.

Die Sequenzanalyse der geschützten Region bei -220/-200 ergab eine perfekte Kopie einer Steroid-Hormonrezeptor-Bindungsstelle (Pfeil) mit der Sequenz AGGTCA (Abbildung 18). Die geschützte Region bei -183/-165 enthält ebenfalls dasselbe Motiv, allerdings auf dem komplementären Strang und in leicht abgewandelter Form (Pfeil). Interessanterweise ergab sich bei genauerer Sequenzanalyse noch eine dritte Stelle mit großer Ähnlichkeit zu der Sequenz AGGTCA. Diese dritte Region liegt jedoch außerhalb der geschützten Bereiche (Abbildung 18, gestrichelter Pfeil), was ein Hinweis



**Abbildung 17** DNase I Footprint der -230/-130 Region von CYP11a1

**A** Autoradiographie eines Promoterfragmentes des Bereichs zwischen -230/-130, bei der der *Sense* Strang markiert wurde. Die Spur *C/T ladder* enthält den Orientierungsmarker, *Probe alone* enthält DNase I verdaute Sonde und *Probe and Protein* enthält Sonde, die in Anwesenheit von C6-Proteinen verdaut wurde. **B** Autoradiographie desselben Fragments, bei der jedoch der komplementäre Strang (*Antisense*) markiert wurde.



**Abbildung 18** Schematische Darstellung der -230/-130 Region

Die im DNase I *Footprinting Assay* geschützten Basen sind doppelt unterstrichen. Nach rechts zeigende Pfeile markieren das Sequenzmotiv eines Steroid-Hormonrezeptors (AGGTCA) auf dem *sense*-, nach links zeigende Pfeile auf dem *antisense*-Strang.

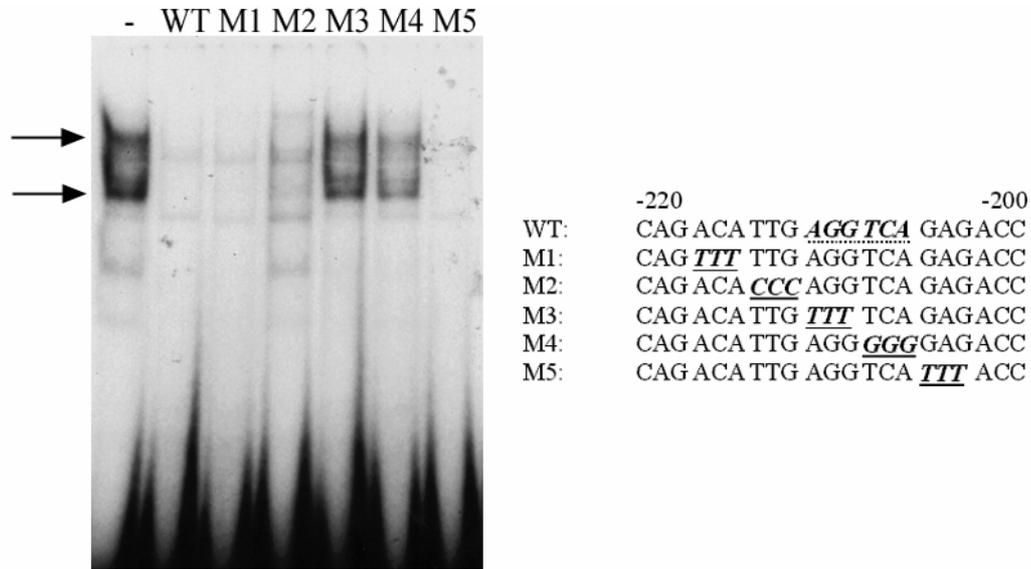
dafür ist, dass sie im *Footprinting Assay* nicht von C6-Proteinen gebunden und damit geschützt wird.

### 3.2.2 Gelretentionsanalyse der geschützten Bereiche

Zur weiteren Charakterisierung der beiden ~ 20 bp langen, im *Footprinting Assay* geschützten Bereiche wurden verschiedene Oligonukleotide beider Bereiche synthetisiert und anschließend in Gelretentionsanalysen verwendet.

#### 3.2.2.1 Nukleäre Proteine der C6-Zellen binden an die -220/-200 Region

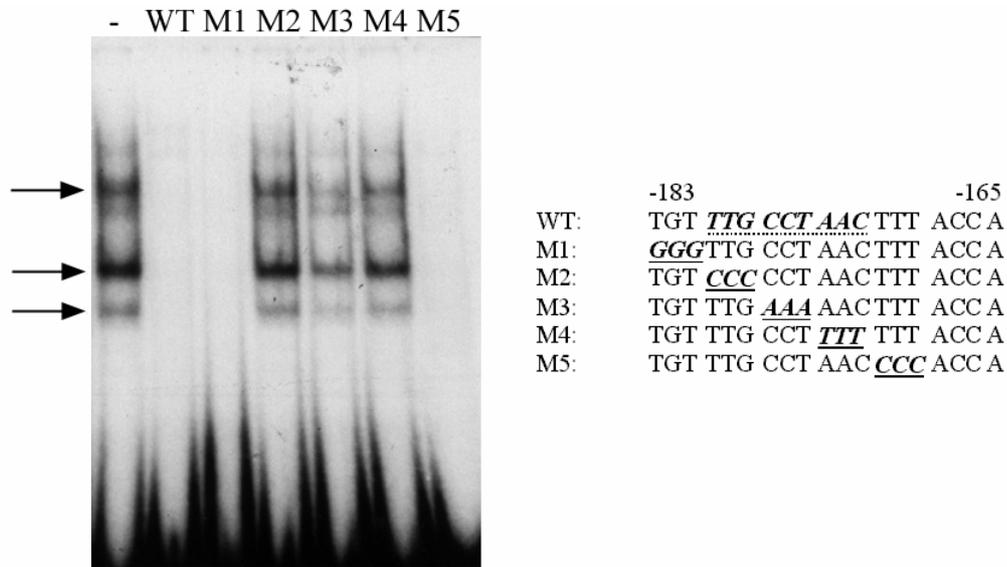
Zur Identifizierung der für die Proteinbindung essentiellen Basen innerhalb des -220/-200 Bereichs wurden neben einem Oligonukleotid mit der Wildtyp-Sequenz auch Oligonukleotide mit einzelnen mutierten Basentriplets synthetisiert. Für die Gelretentionsanalyse wurde das doppelsträngige Oligonukleotid mit der Wildtypsequenz radioaktiv markiert. Nach Inkubation mit C6-Extrakt und elektrophoretischer Auftrennung zeigten sich zwei Protein:DNA-Komplexe (Abbildung 19, Spur #1 (Pfeile)). Beide Komplexe banden die DNA in einer sequenzspezifischen Art und Weise, da sie mit einem 50 x molaren Überschuss an „kalter“ DNA verdrängt werden konnten (Abbildung 19, Spur #2). Zur genauen Eingrenzung der für die Proteinbindung wichtigen Basen wurden nun weitere Kompetitionsversuche mit mutierten Basentriplets durchgeführt (Abbildung 19, Spur #3-7). Hier zeigte sich, dass die drei Mutanten M1, M2 und M5, mit der Wildtyp-Sequenz um die Bindung der beiden Proteine konkurrieren, nicht jedoch die beiden Mutanten M3 (-211/-209: AGG → TTT) und M4 (-208/-206 TCA → GGG). Daraus ergibt sich, dass die zentralen sechs Basen zwischen -211 und -206 (AGGTCA) essentiell für die Bindung der Proteine an dieses Oligonukleotid sind.



**Abbildung 19** Kompetitions-Gelretentionsanalyse der -220/-200 Region  
 Autoradiographie der -220/-200WT Sonde mit C6-Extrakt. Spur - enthält keine Kompetitor-DNA, die Spur WT (bzw. M1, M2, M3, M4, M5) enthält einen 50 x molaren Überschuss an WT (bzw. M1, M2, M3, M4, M5) Oligonukleotid. Die für die Protein:DNA-Interaktion essentiellen Basen sind fett, kursiv und gepunktet unterstrichen dargestellt.

### 3.2.2.2 Nukleäre Proteine der C6-Zellen binden an die -183/-165 Region

Für den zweiten im *Footprinting Assay* geschützten Bereich zwischen -183 und -165 wurde analog wie für die -220/-200 Region verfahren. Nach Inkubation der -183/-165WT Sonde mit Proteinextrakt der C6-Zellen zeigten sich für diese Region nach Elektrophorese drei Protein:DNA-Komplexe (Abbildung 20, Spur #1 [Pfeile]). Alle drei Komplexe konnten mit einem 50 x molaren Überschuss an „kaltem“ Oligonukleotid verdrängt werden und waren somit ebenfalls spezifisch (Abbildung 20, Spur #2). In den Konkurrenzexperimenten mit mutierten Oligonukleotiden zeigte sich, dass nur die Mutanten M1 und M5 mit der Wildtyp-Sequenz um die Proteinbindung konkurrierten, nicht aber die Mutanten M2 (-180/-178: TTG → CCC), M3 (-177/-175: CCT → AAA) und M4 (-174/-172: AAC → TTT) (Abbildung 20, Spur #3-7). Hieraus ergibt sich, dass die zentralen neun Basen zwischen -182 und -174 (TTGCCTAAC) wichtig für die Bindung der drei Proteine an die DNA sind.

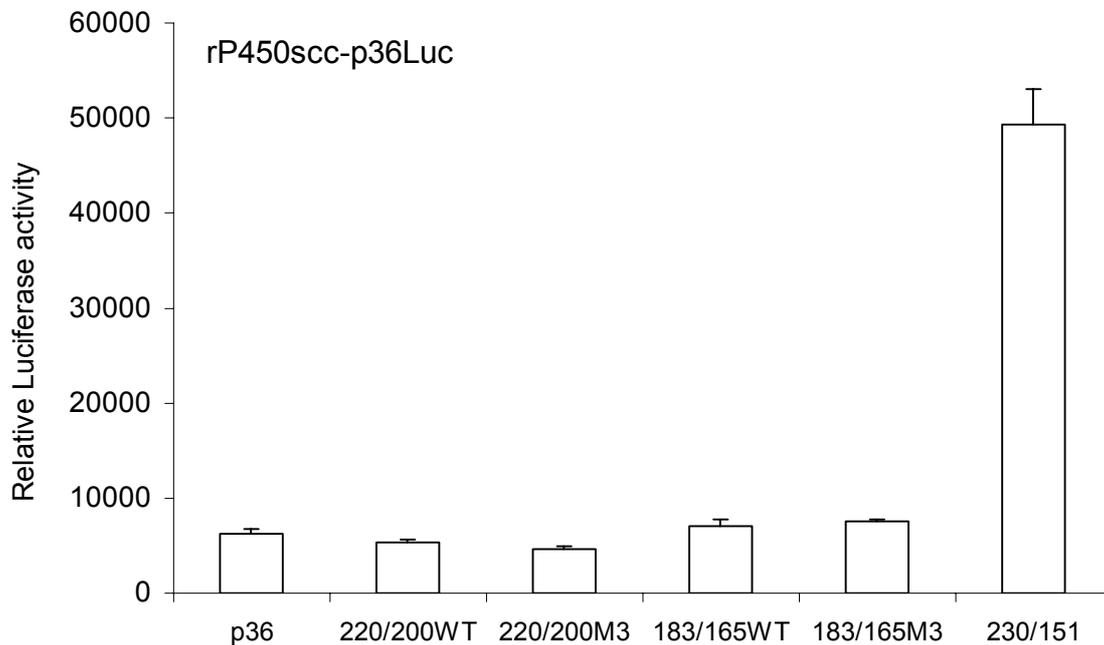


**Abbildung 20** Kompetitions-Gelretentionsanalyse der -183/-165 Region

Autoradiographie der -183/-165WT-Sonde mit C6-Extrakt. Spur - enthält keine Kompetitor-DNA, die Spur *WT* (bzw. *M1*, *M2*, *M3*, *M4*, *M5*) enthält einen 50 x molaren Überschuss an *WT* (bzw. *M1*, *M2*, *M3*, *M4*, *M5*) Oligonukleotid. Die für die Protein:DNA-Interaktion essentiellen Basen sind fett, kursiv und gepunktet unterstrichen dargestellt.

### 3.2.3 Die -200/-181 und -183/-165 Regionen sind funktionell inaktiv

Zur funktionellen Charakterisierung der Region zwischen -220/-200 und -183/-165 wurden jeweils die Wildtyp-Sequenz und die Mutante 3 (M3) beider Regionen sowie ein beide Regionen umspannendes Promoterfragment (-230/-151) vor einen Prolaktin-Minimalpromoter und ein Luciferase-Reportergen kloniert (2.8.1.2) und in C6-Zellen transfiziert. Überraschenderweise zeigte sich, dass weder die -220/-200WT- noch die -183/-165WT-Sequenz die transkriptionelle Aktivität des „leeren“ p36-Luciferase-Vektors steigern konnte. Durch Transfektion eines die beiden Regionen umspannenden Promoterfragments konnte jedoch die basale Aktivität im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 9 gesteigert werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21** Transkriptionelle Aktivität der -220/-165 Region

Transfektion von WT- und M3-Oligonukleotiden der -220/-200 und der -183/-165 Region sowie eines beide Bereiche umspannenden Oligonukleotids (-230/-151), die vor einen Prolaktin-Minimalpromoter und ein Luciferase-Reportergen kloniert wurden, in C6-Zellen. Balken geben die relative Luciferase-Aktivität (RLU) wieder.

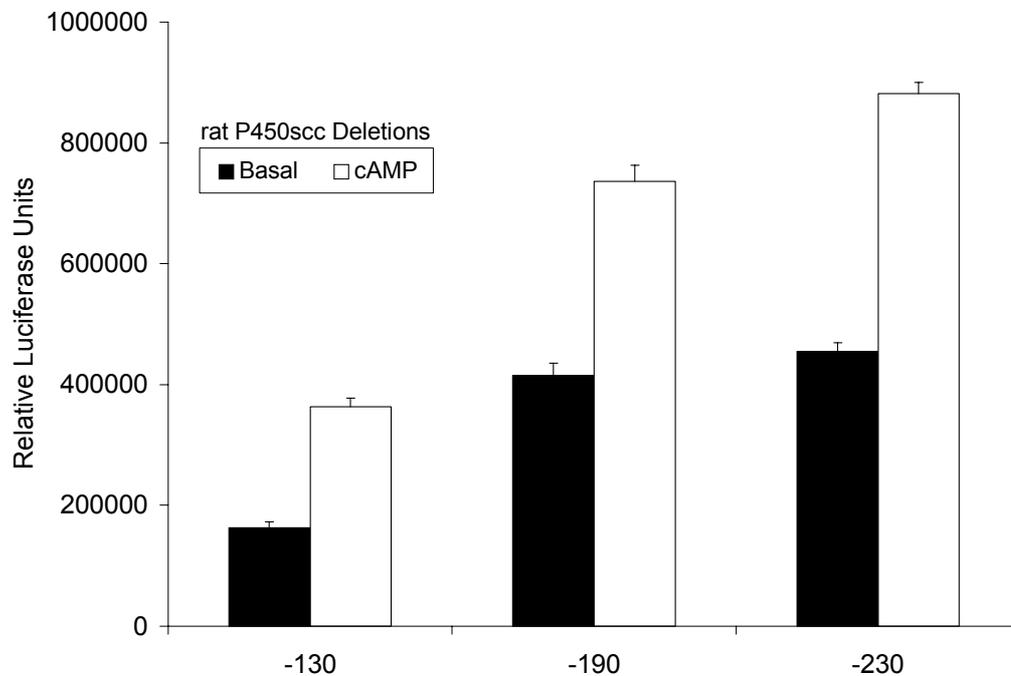
### 3.2.4 Die Region zwischen -230/-190 ist transkriptionell inaktiv

Die transkriptionelle Aktivität des -230/-151-Promoterfragmentes auf der einen und die Inaktivität des -220/-200 wie auch des -183/-165 Bereichs auf der anderen Seite wirft die Frage auf, ob möglicherweise diese beiden Bereiche nur in Kombination transkriptionell aktiv sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurden drei Deletionen des P450scc-Promoters von 130 bp, 190 bp und 230 bp Länge vor ein Luciferase-Reportergen kloniert und in C6-Zellen transfiziert. In guter Übereinstimmung mit zuvor erhobenen Transfektionsdaten (Zhang et al., 1995) war die 230 bp lange Deletion transkriptionell aktiver als die 130 bp lange Deletion (Abbildung 22). Das Konstrukt mit der 190 bp langen Promoterdeletion hingegen zeigte die gleiche transkriptionelle Aktivität wie die 230 bp umfassende Deletion. Dies bedeutet, dass zum einen die -230/-191 Region an der Aktivierung des CYP11a1-Promoters vollkommen unbeteiligt ist und dass zum anderen die transkriptionelle Aktivität durch Promoterelemente zwischen -190

und -130 übertragen werden muss, wobei der Bereich zwischen -183/-165 hierfür mangels transkriptioneller Aktivität ausgeschlossen werden kann (Abbildung 21).

---

---



---

**Abbildung 22** Transkriptionelle Aktivität von CYP11a1-Deletionsmutanten  
P450scc-Promoterdeletionen verschiedener Längen wurden vor ein Luciferase-Reportergen kloniert und in C6-Zellen transfiziert. Schwarze Balken geben die relative Luciferase-Aktivität (RLU) ohne, weiße Balken nach achtstündiger cAMP-Stimulation wieder.

---

---

## 4 Diskussion

Die transkriptionelle Regulation von Enzymen der Steroidogenese im Allgemeinen und von P450scc im Speziellen wurde bisher ausschließlich in klassischen, steroid-produzierenden Geweben wie der Nebenniere, den Gonaden und der Placenta untersucht. Im Nervensystem hingegen wurde bisher fast ausschließlich qualitativ die Präsenz von P450scc-mRNA und -Protein und die biochemische Aktivität des Enzyms nachgewiesen und beschrieben. Eine gewebespezifische Analyse der Regulation dieses Enzyms im Gehirn wurde bisher kaum untersucht und ist infolgedessen nur ungenügend verstanden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die transkriptionelle Regulation des CYP11a1-Gens, das für das Schlüsselenzym der Steroidogenese P450scc kodiert, im Nervensystem besser zu verstehen und diese mit den Daten aus Gonaden und Nebennieren zu vergleichen. Die Experimente dieser Arbeit wurden in einer Glia-Zelllinie der Ratte durchgeführt, die hierfür aufgrund der endogenen Expression von P450scc ein geeignetes Zellsystem ist.

### 4.1 Charakterisierung der -130/-94 Region

In früheren Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des P450scc-Gens in der glialen Zelllinie C6 konnte in Transfektionsexperimenten gezeigt werden, dass die -130/-94 Region des P450scc-Promoters funktionell aktiv ist. In der Gelretentionsanalyse zeigte sich, dass dieser DNA-Abschnitt von einem nukleären Protein der C6-Zellen gebunden wird. Diese Bindung stellte sich in Kompetitions-Gelretentionsanalysen als sequenzspezifisch heraus und konnte auf eine zentrale GC-reiche Sequenz reduziert werden. Trotz großer Ähnlichkeit dieser zentralen GC-reichen Sequenz der -130/-94 Region mit der Konsensus-Sequenz der Transkriptionsfaktorenfamilie der Sp-Proteine (Kadonaga et al., 1987) konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Protein nicht um den Transkriptionsfaktor Sp1 handelt (Zhang et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit gelang es nun dieses DNA-bindende Protein zu isolieren und als *Ku*-Komplex zu identifizieren. Darüber hinaus konnten noch weitere

DNA-bindende Proteine gefunden werden, die ebenfalls an die -130/-94 Region des CYP11a1-Gens binden. Es handelt sich hierbei um die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp4, zwei Mitglieder der Sp-Proteinfamilie.

#### 4.1.1 Der *Ku*-Komplex

Der *Ku*-Komplex wurde ursprünglich als auslösendes Auto-Antigen in einer Reihe von Autoimmunerkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie dem systemischen Lupus erythematoses (SLE), der Sklerodermie und dem Sjögren-Syndrom identifiziert (Mimori et al., 1981; Mimori und Hardin, 1986; Reeves, 1985). Der Name „*Ku*“ leitet sich von den beiden ersten Buchstaben des Namens des ersten Patienten ab, bei dem die Autoantikörper nachgewiesen werden konnten (Mimori et al., 1981). Der *Ku*-Komplex ist ein Heterodimer und setzt sich aus zwei Untereinheiten, *Ku70* (p70) und *Ku80* (p80), zusammen. *Ku* ist in der Lage, in unspezifischer Weise Enden doppelsträngiger DNA zu binden. Durch Bindung des *Ku*-Komplexes an DNA kommt es konsekutiv zur Rekrutierung und Aktivierung der katalytischen Untereinheit (PK<sub>CS</sub>), einer Serin-/Threoninkinase, die in der Lage ist, andere Proteine zu phosphorylieren (Gottlieb und Jackson, 1993). Daher wird *Ku* auch als DNA-bindende regulatorische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase bezeichnet.

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass *Ku* eine wichtige Rolle bei Reparaturvorgängen von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt. Zellen mit einer Mutation in der großen Untereinheit (*Ku80*) sind äußerst sensibel gegenüber ionisierender Strahlung (Smider et al., 1994; Taccioli et al., 1994). Des Weiteren spielt der *Ku*-Komplex eine wichtige Rolle bei der lymphozytären V(D)J-Rekombination. Hierunter versteht man ein für die Diversität der Immunglobuline und T-Zellrezeptoren essentielles zelluläres Verfahren, bei dem es durch kontrollierte Doppelstrangbrüche und konsekutive Wiedervereinigung von DNA-Abschnitten zur Rekombination genomischer DNA kommt, wodurch sich Klone mit unterschiedlichen Antigenbindungsspezifitäten ausbilden können. Treten in diesem Rekombinationsprozess Fehler auf, kann es zur Entstehung entarteter Lymphozyten und Krebserkrankungen kommen (Rabbitts, 1994). Diese *in vitro* gewonnenen funktionellen Daten konnten durch Disruption des Gens für *Ku70* und *Ku80* *in vivo* bestätigt werden.

Sowohl die  $Ku70^{-/-}$ - als auch die  $Ku80^{-/-}$ -Mäuse zeigen aufgrund mangelnder DNA-Reparationsfähigkeit eine Überempfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung und haben eine gestörte V(D)J-Rekombination (Nussenzweig et al., 1996; Ouyang et al., 1997; Zhu et al., 1996). Auch der funktionelle Ausfall der katalytischen Untereinheit (PK<sub>CS</sub>) resultiert in einer gestörten Fähigkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen (Blunt et al., 1996).

Bislang konnte für einige Transkriptionsfaktoren gezeigt werden, dass sie von der DNA-abhängigen Proteinkinase *in vitro* phosphoryliert werden können. Hierzu gehören die Transkriptionsfaktoren Sp1 (Gottlieb und Jackson, 1993), c-jun (Bannister et al., 1993), Oct1 und p53 (Wang et al., 1994) und der Glucocorticoidrezeptor (Giffin et al., 1997). Daher scheint die DNA-abhängige Proteinkinase neben ihrer Funktion als Reparaturenzym auch eine Bedeutung in der Regulation eukaryotischer Gene im Sinne eines Transkriptionsfaktors zu spielen. Hierzu ist jedoch eine sequenzspezifische Interaktion des *Ku*-Komplexes mit regulatorischen DNA-Elementen in Abwesenheit von DNA-Enden notwendig. Bis heute wurden verschiedene Bindungsmotive in Promotorbereichen unterschiedlicher Gene beschrieben, an die der *Ku*-Komplex *in vitro* binden kann. Hierzu gehören der Promoter des Transferrin-Rezeptors, des Osteocalcins, der Tetracyclin-resistenten sauren Phosphatase (TRAP), des CD34 und CD23 Gens, der Glutathion Peroxidase und des P450c17-Gens (Tabelle 4). Darüber hinaus wurden auch die Bindungen von *Ku* an virale Sequenzen, wie der des humanen T-Zell Leukämie Virus-I und des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) beschrieben (Tabelle 4). Aufgrund der Unterschiede in den identifizierten Bindungssequenzen ergibt sich in der Zusammenschau kein Konsensusbindungsmotiv für *Ku*, wie dies klassischerweise für andere Transkriptionsfaktoren der Fall ist. Einige dieser Arbeiten sind jedoch äußerst kritisch einzuschätzen, da *Ku* über eine biochemische Aufreinigung isoliert wurde, bei der aufgrund des Einsatzes von Oligonukleotiden nicht ausgeschlossen werden kann, dass *Ku* in diesen Assays nicht direkt an die zentrale DNA Sequenz des Oligonukleotids bindet, sondern vielmehr über die Bindung der DNA-Enden zu den beschriebenen Sequenzen transloziert (Giffin et al., 1996). Eine Möglichkeit, die Bindung von *Ku* an DNA-Enden in Gelretentionsanalysen auszuschließen ist der Einsatz von kleinen, radioaktiv markierten, zirkulären DNA-Sonden (*minicircle*), die das entsprechende Bindungsmotiv aufweisen. Durch diese Technik konnte eine

sequenzspezifische Bindung von *Ku* ohne das Vorhandensein von DNA-Enden an das NRE1-Element des MMTV-Promoters (Giffin et al., 1996) sowie an das HRE-Element des TRAP-Promoters (Reddy et al., 1998) demonstriert werden.

Aus technischen Gründen gelang die Herstellung einer zirkulären Sonde mit der GC-reichen Sequenz des P450scc-Promoters in der vorliegenden Arbeit nicht, weshalb eine indirekte Bindung von *Ku* an die GC-reiche Sequenz über die DNA-Enden des Oligonukleotids nicht ausgeschlossen werden kann. Zwei Ergebnisse sprechen jedoch eindeutig für eine funktionelle Bedeutung von *Ku* bei der transkriptionellen Regulation des CYP11a1-Gens. Zum einen konnte durch Ko-Transfektion der beiden *Ku*-Untereinheiten die Aktivität des Reportergens, das unter dem Einfluß des -130/-94 Promoterelements stand, verdoppelt werden. Eine Mutation der GC-reichen Region resultierte jedoch in einem vollständigem Verlust der Aktivierung. Dieses Ergebnis zeigt, dass *Ku* auch unabhängig von DNA-Enden in einer sequenzspezifischen Weise an das GC-reiche Element des P450scc-Promoters binden kann. Zum anderen deutet die in der Immunhistochemie gefundene Ko-Lokalisation von *Ku* und P450scc in vielen Abschnitten des ZNS auf eine physiologisch-funktionelle Bedeutung von *Ku* für die Transkription von P450scc hin. Darüber hinaus wurden auch bei Promotoren zweier anderer Gene Interaktionen von *Ku* mit G-reichen Sequenzen gefunden. Hierbei handelt es sich um den Promoterbereich von CD23 und CD34 (Tabelle 4).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Ku* an die GC-reiche Promotersequenz [GGGCGGGG] bindet und darüber hinaus *in vitro* die Transkription des P450scc-Gens aktivieren kann. Ob hierbei die Phosphorylierung anderer Transkriptionsfaktoren durch die DNA-abhängige Proteinkinase eine Rolle spielt, ist unbekannt.

Über die Expression von *Ku* im Nervensystem gibt es bisher nur wenig Erkenntnisse. Mittels Gelretentionsanalysen und Western-Blots fand sich sowohl während der Entwicklung als auch bei adulten Nagern eine stabile Expression von *Ku* im ZNS, insbesondere im Kleinhirn und der weißen Substanz (Bakalkin et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide *Ku*-Untereinheiten und P450scc zu einem späten Zeitpunkt (E18.5) in der ZNS-Entwicklung ko-lokalisiert sind. *Ku* könnte somit zu diesem Gestationszeitpunkt an der Regulation des CYP11a1-Gens im ZNS beteiligt sein. Eine funktionelle Bedeutung von *Ku* für die Regulation von

P450scc in sämtlichen ZNS Regionen sowie zu früheren Zeitpunkten in der Entwicklung ist allerdings äußerst unwahrscheinlich.

Bei der säulenchromatographischen Auftrennung der C6-Proteine zeigte sich neben der erwarteten Bande in den Fraktionen #31-38 eine weitere Bande in den Fraktionen #25-28, die zuvor nicht detektiert werden konnte. Das an dieser Bande beteiligte DNA-bindende Protein scheint ein deutlich niedrigeres Molekulargewicht als der *Ku*-Komplex zu besitzen, da dieser DNA:Protein-Komplex weiter als der *Ku*-Komplex durch das Gel wandert. Warum die Bindung dieses Proteins erst nach säulenchromatographischer Auftrennung in der Gelretentionsanalyse detektiert wurde, ist unklar. Ob es sich bei diesem Protein möglicherweise tatsächlich um einen neuen Transkriptionsfaktor handelt, der sequenzspezifisch an die -130/-94 Region des P450scc-Promoters bindet, wurde nicht untersucht. Prinzipiell ist jedoch denkbar, dass es sich bei diesem Protein um einen weiteren Transkriptionsfaktor des P450scc-Gens handelt.

| Gen                   | Bindungsmotiv  | Element  |                              |
|-----------------------|----------------|----------|------------------------------|
| P450scc               | GGGCGGGG       | -130/-94 |                              |
| CD23                  | GGGGGCGGGGG    | EBVRE    | (Shieh et al., 1997)         |
| CD34                  | GGGGTCGG       | -54/-48  | (Taranenko und Krause, 2000) |
| MMTV                  | GAGAAAGAGAAAGA | NRE1     | (Giffin et al., 1996)        |
| Glutathion Peroxidase | CCTCTGAGAAA    | ORE1     | (Merante et al., 2002)       |
| Transferrin Rezeptor  | AATGTACG       | TRA      | (Roberts et al., 1994)       |
| Osteocalcin           | GCAGTCA        | OCFRE    | (Willis et al., 2002)        |
| TRAP                  | GGAGGCGAGGCGC  | HRE      | (Reddy et al., 1998)         |
| P450c17               | AACTCGACGTC    |          |                              |
|                       | AAGGTGACAA     | -84/-53  | (Zhang et al., 1999)         |

**Tabelle 4** Bindungssequenzen von *Ku*  
Zusammenstellung der bisher identifizierten Bindungssequenzen von *Ku* in Promotorregionen verschiedener Gene.

Sowohl die Ergebnisse der Gelretentionsanalysen als auch des *Ku*-Western-Blots deuteten darauf hin, dass *Ku* in der C6-Zelllinie sehr stark exprimiert wird. Zur Reduktion der Bindung von *Ku* an die GC-reiche Sonde wurde der nukleäre C6-Proteinextrakt zunächst mit poly dI\*dC, einem synthetischen doppelsträngigen DNA-

Carrier, präinkubiert (Klug, 1997). Hierdurch konnte erreicht werden, dass ein großer Teil des *Ku*-Proteins vor Zugabe der DNA-Sonde an das poly dI\*dC gebunden wurde, wodurch die *Ku*-Bande in der Gelretentionsanalyse wie erwartet deutlich schwächer wurde. Überraschenderweise kamen durch diese methodische Umstellung des Assays zwei weitere Banden zur Darstellung, die belegen, dass neben *Ku* auch andere Proteine aus dem C6-Extrakt sequenzspezifisch an die -130/-94 Region des P450scc-Promoters binden können. Auf welchen Mechanismus die Inhibition dieser neuen DNA:Protein-Komplexe durch *Ku* zuvor zurückzuführen ist, ist vollkommen unklar, da die radioaktive Sonde in jedem Experiment im Überschuss zugesetzt wurde und dadurch ein relativer Mangel an Sonde ausgeschlossen werden kann.

#### 4.1.2 Die Familie der Sp-Proteine

Durch Verwendung von Antikörpern gegen die Sp-Transkriptionsfaktoren konnten in der Gelretentionsanalyse zwei dieser neu detektierten DNA-bindenden Proteine als Sp1 und Sp4 identifiziert werden. Dies zeigt zum einen, dass Sp1 und Sp4 in der C6-Zelllinie exprimiert werden, und zum anderen, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren an das -130/-94 Element des CYP11a1-Promoters binden können. Eine Interaktion von Sp1 mit der Promoterregion von P450scc konnte bereits beim Schwein (Urban und Bodenburg, 1996), beim Rind (Ahlgren et al., 1990; Liu und Simpson, 1997; Momoi et al., 1992) und beim Menschen (Chou et al., 1996; Guo et al., 1994) gezeigt werden. Diese Untersuchungen wurden jedoch in Zelllinien klassischer steroid-produzierender Gewebe, wie Placenta, Nebenniere und Hoden, durchgeführt. Die Tatsache, dass sich nach Zugabe von Antikörpern gegen Sp2 und Sp3 keine Veränderungen in der Gelretentionsanalyse zeigten, deutet mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf hin, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren in der C6-Zelllinie nicht exprimiert werden. Prinzipiell ist eine transkriptionelle Regulation des CYP11a1-Gens durch Sp2 und Sp3 *in vivo* jedoch durchaus denkbar. Ein Versuch, die Expression von Sp2 und Sp3 durch einen Western-Blot mit C6-Proteinextrakt zu untersuchen, scheiterte an der mangelnden Spezifität der Antikörper.

Die in dieser Studie gewonnen immunhistochemischen Daten deuten darauf hin, dass die Sp-Proteine, insbesondere Sp4, schon sehr früh in der Entwicklung, aber

auch nach der Geburt in vielen Bereichen des ZNS mit P450scc ko-lokalisiert sind und damit möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der gewebespezifischen Expression von P450scc spielen könnten.

#### 4.1.2.1 Sp1

Die Sp-Proteine gehören zu einer Multigen-Familie von Transkriptionsfaktoren (Hagen et al., 1992; Kingsley und Winoto, 1992). Bei den Familienmitgliedern Sp 1-4 handelt es sich um Zinkfingerproteine, die, mit Ausnahme von Sp2, eine hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne besitzen, die GC- bzw. GT-reiche DNA-Sequenzen mit ähnlicher Spezifität binden können (Hagen et al., 1992; Hagen et al., 1994; Kingsley und Winoto, 1992). Sp1, Sp2 und Sp4 sind transkriptionelle Aktivatoren, wohingegen Sp3 bifunktionale Aktivitäten besitzt und in Abhängigkeit von dem Promoterkontext sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken kann (Majello et al., 1997). Die Aktivität von Sp1 kann posttranslational durch zwei Mechanismen beeinflusst werden. Hierbei handelt es sich zum einen um die Glykosylierung (Han und Kudlow, 1997; Jackson und Tjian, 1988; Roos et al., 1997) und zum anderen um die Phosphorylierung von Sp1 durch verschiedene Kinasen, wie der DNA-abhängigen Kinase (DNA-PK) (Jackson et al., 1990), der Proteinkinase A (PKA) (Rohlf et al., 1997) und anderen. Daher scheint es sehr wahrscheinlich, dass die cAMP induzierte Aktivierung des P450scc-Promoters durch das GC-reiche -130/-94 Element wohl am ehesten auf die Phosphorylierung von Sp1 durch PKA zurückzuführen sein dürfte, da dieses Element von Sp1 gebunden wird. Über eine in diesem Zusammenhang denkbare Aktivierung der Transkription durch eine PKA-vermittelte Phosphorylierung von Sp4 ist bisher nichts bekannt.

Sp1 ist involviert in die Aktivierung sehr vieler unterschiedlicher Gene, wie die der *house keeping genes* (Philipsen und Suske, 1999; Saffer et al., 1991) sowie gewebespezifischer und Zellzyklus regulierter Gene (Black et al., 1999). Daneben ist Sp1 auch für die Aktivierung viraler Gene von großer Bedeutung (Dyanan et al., 1985). Da Sp1 sowohl während der Entwicklung als auch bei adulten Mäusen ubiquitär exprimiert wird, werden die regulatorischen Eigenschaften zum einen der sehr variablen Expressionsstärke von Sp1 und zum anderen dem Gleichgewicht aus aktivierendem Sp1

und reprimierendem Sp3 zugeschrieben, die beide um die gleiche Bindungssequenz konkurrieren (Suske, 1999). Mit immunhistochemischen Methoden konnte gezeigt werden, dass Sp1 im ZNS von Mäusen ab dem Tag E8.5 in vielen Bereichen exprimiert wird (Saffer et al., 1991). Obwohl embryonale Stammzellen der Maus mit einer homozygoten Null-Mutation (*knock out*) des Sp1 Gens sich zunächst normal weiterentwickeln, kommt es im Folgenden zu einer deutlich verlangsamten Entwicklung der Foeten mit vielen morphologischen Veränderungen, die zum Zeitpunkt E11 schließlich zum intrauterinen Tod der Foeten führen. Interessanterweise exprimieren die Sp1-Null-Mäuse viele zuvor identifizierte Sp1-regulierte Gene mit unveränderter Stärke, was auf eine gewisse Redundanz innerhalb der Familie der Sp-Proteine hinweisen könnte (Marin et al., 1997).

#### 4.1.2.2 Sp4

Im Gegensatz zu Sp1 handelt es sich bei Sp4 um ein Familienmitglied, das gewebespezifisch exprimiert wird. In ausgewachsenen Mäusen wird im *Northern-Blot* die stärkste Expression von Sp4 im Gehirn und im Skelettmuskel, eine schwächere Expression außerdem im Herz, in der Milz, der Leber und den Hoden gefunden (Supp et al., 1996). Während der foetalen Entwicklung der Maus lässt sich Sp4 durch *in situ*-Hybridisierung zum Zeitpunkt E10 am stärksten im ZNS nachweisen. In E12 alten Mäuseembryonen wird Sp4 darüber hinaus auch in der Retina, den Hirnnerven, dem *Ganglion trigeminale* und den Spinalganglien, aber auch in nicht neuronalen Strukturen wie der nasalen Mukosa, dem vomeronasalen Organ, der Leber und dem Intestinaltrakt exprimiert. In E16 alten Embryonen hingegen ist die Expression auf das Gehirn, das Rückenmark und die sympathischen und Spinal-Ganglien beschränkt (Supp et al., 1996). Im Gegensatz zu Sp1<sup>-/-</sup> Mäusen entwickeln sich Sp4-*knock out*-Mäuse zunächst normal und zeigen keine morphologischen Veränderungen. Innerhalb der ersten drei Lebenswochen versterben jedoch 2/3 der Tiere aus unbekanntem Gründen. Weibliche Sp4<sup>-/-</sup> Tiere sind in ihrer Fertilität geringfügig eingeschränkt und durchlaufen die Pubertät erst deutlich später als Wildtyp-Mäuse, wohin gegen männliche Tiere, trotz histologisch unauffälliger Hoden und intakter Spermiogenese, nicht kopulieren, was darauf hinweist, dass Sp4 essentiell für das männliche Reproduktionsverhalten ist.

Darüber hinaus fanden sich keine funktionellen oder morphologischen neurologischen Defizite (Gollner et al., 2001; Supp et al., 1996).

Trotz des wider Erwarten blanden Phänotyps der Sp4-*knock out*-Mäuse wäre ein Vergleich der Expression von P450scc im ZNS dieser Tiere mit Wildtyp-Mäusen, insbesondere auch während der embryonalen Entwicklung, äußerst interessant. Unter Umständen könnten auf diese Weise Regionen identifiziert werden, in denen Sp4 für die Expression von P450scc von essentieller Wichtigkeit ist. Aufgrund der zentralen Stellung von P450scc in der Reproduktion kann darüber spekuliert werden, ob es womöglich aufgrund der Defizienz von Sp4 und konsekutiv damit auch von P450scc zu einem regionalen Mangel an Neurosteroiden kommt, was eine mögliche Ursache sowohl für die Pubertätsverzögerung der weiblichen als auch für das fehlende Kopulationsverhalten der männlichen Tiere darstellen könnte. Bisher konnte nur für ein einziges Gen gezeigt werden, dass es zumindest *in vitro* selektiv durch Sp4, nicht aber durch Sp1, 2 oder 3 aktiviert werden kann. Hierbei handelt es sich um die  $\beta$ -Untereinheit der Rod cGMP-Phosphodiesterase, ein Schlüsselenzym der Phototransduktion in der Retina (Lerner et al., 2002).

## 4.2 Charakterisierung der -230/-151 Region

In der vorliegenden Arbeit wurde über das -130/-94 Element hinaus auch die weiter stromaufwärts gelegene Region zwischen -230 und -130 des P450scc-Promoters untersucht. Für diese Region konnte schon in einer zuvor durchgeführten Studie in C6-Zellen gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen für die basale Transkription des P450scc-Gens funktionell aktiven Promoterbereich handelt (Zhang et al., 1995). Zur weiteren Charakterisierung dieses Bereichs wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst ein DNA *Footprinting Assay* durchgeführt. Hierbei konnten zwei DNA-Abschnitte detektiert werden, die von Proteinen eines nukleären C6-Zellextraktes gebunden werden. Kompetitive Gelretentionsanalyse mit Oligonukleotiden der beiden Regionen bestätigten, dass sowohl die -220/-200 als auch die -183/-165 Region in einer sequenzspezifischen Weise von C6-Proteinen gebunden werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass für die -220/-200 Region eine zentrale Sequenz bestehend aus sechs und für die -183/-165 Region eine zentrale Sequenz, bestehend aus neun

Basenpaaren essentiell für die Bindung der C6-Proteine war. Überraschenderweise waren die aus dem Promoterkontext isolierten Oligonukleotide des -220/-200 und des -183/-165 Bereichs transkriptionell inaktiv. Auch eine für die transkriptionelle Aktivierung denkbare Interaktion der DNA-bindenden Proteine des -220/-200 und -183/-165 Bereichs konnte durch eine 190 bp lange Deletion des natürlichen Promoters ausgeschlossen werden. Diese Deletion beinhaltet nur die -185/-165, nicht aber die -220/-200 Region, besitzt jedoch dieselbe transkriptionelle Aktivität wie eine 230 bp lange Promoterdeletion, was darauf hinweist, dass der Bereich zwischen -230 und -190 in C6-Zellen transkriptionell inaktiv ist. Hieraus kann geschlossen werden, dass sich die transkriptionell aktiven Promoterelemente im Bereich -190 und -150 befinden, wobei sich der im *Footprinting Assay* geschützte -183/-165 Bereich zuvor schon als inaktiv herausgestellt hatte. Die aktiven Elemente sind somit mit hoher Wahrscheinlichkeit in den angrenzenden DNA-Regionen zwischen -190 und -184 sowie -164 und -151 zu suchen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es sich bei den beiden Bereichen -220/-200 und -185/-165 um Promotersequenzen handelt, die zwar jeweils von mehreren nukleären C6-Proteinen in einer sequenzspezifischen Art und Weise gebunden werden, aber offensichtlich nicht an der basalen transkriptionellen Regulation des CYP11a1-Gens in glialen C6-Zellen beteiligt sind. Es kann darüber spekuliert werden, ob diese DNA-bindenden Proteine vielleicht bei der Vermittlungen von extrazellulären Stimuli auf die Expression des P450scc-Gens entweder selbst durch posttranslationale Veränderungen (z.B. Phosphorylierung) oder durch Interaktionen mit anderen Stimulus-abhängigen Proteinen zu aktiven Transkriptionsfaktoren werden.

---

## 5 Zusammenfassung

Neurosteroide sind Steroidhormone, die im Nervensystem *de novo* aus Cholesterin oder einem anderen frühen Vorläufersteroid synthetisiert werden. Im Gegensatz zu den klassischen Steroidhormonen der Nebenniere und der Gonaden, die ihre Zielorgane über die Zirkulation erreichen, wirken Neurosteroide lokal in einer auto- und parakrinen Weise vorwiegend durch membranständige Neurotransmitterrezeptoren, wodurch es im zentralen Nervensystem zu anxiolytischen, antiepileptischen, neuroprotektiven und kognitiven Effekten kommt. Im peripheren Nervensystem entfalten Neurosteroide ihre Wirkung über klassische Steroidhormonrezeptoren und sind an der Myelinisierung von Nervenscheiden beteiligt. Die Synthese von Neurosteroiden wird sowohl im ZNS als auch im PNS durch dieselben Enzyme katalysiert wie in den klassischen steroid-produzierenden Geweben, wobei die relative Expressionsstärke auf mRNA- und Protein-Ebene im Gehirn deutlich schwächer ist als in den Nebennieren und Gonaden.

Das Schlüsselenzym der Steroidogenese, P450 *side chain cleavage* (P450scc), ist das Produkt des CYP11a1-Gens und katalysiert den ersten Schritt der Steroidogenese, die Konversion von Cholesterin zu Pregnenolon. In den Nebennieren und Gonaden wird die Expression des P450scc-Enzyms auf transkriptioneller Ebene im Wesentlichen durch die Transkriptionsfaktoren *Steroidogenic Factor -1* (SF-1) und Sp1 reguliert, die an konservierte DNA-Elemente im Promoterbereich des CYP11a1-Gens binden können. Im Nervensystem wird P450scc vornehmlich in Zellen glialen Ursprungs exprimiert. Im Gegensatz hierzu wird SF-1 nur in einigen Zellen der Hypophyse und im ventromedialen Kerngebiet des Hypothalamus exprimiert und spielt somit für die Expression von P450scc im Nervensystem im Gegensatz zu der in klassischen steroid-produzierenden Geweben keine Rolle.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, andere Transkriptionsfaktoren sowie die korrespondierenden regulatorischen Bereiche im Promoterbereich zu identifizieren, die an der gewebespezifische Transkription des CYP11a1-Gens im Nervensystem beteiligt sind. Die Untersuchungen hierzu wurden in einer Zelllinie durchgeführt, die einem Gliom der Ratte entstammt und das P450scc-Enzym endogen exprimiert.

Vorarbeiten zeigten, dass ein GC-reicher Bereich zwischen -130 und -94 des CYP11a1-Promoters transkriptionell aktiv ist und von einem nukleären Protein der C6-Zellen in einer sequenzspezifischen Weise gebunden wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Protein nun durch biochemische Aufreinigung isoliert und als *Ku*-Komplex identifiziert werden. In Transfektionsexperimenten zeigte sich, dass *Ku* durch Bindung an die GC-reiche Sequenz des -130/-94 Elements *in vitro* die Transkription des CYP11a1-Gens aktiviert. Weiterhin konnte durch immunhistochemische Färbungen von Mäuse-Gehirnen gezeigt werden, dass *Ku* in einigen Regionen mit P450scc ko-exprimiert wird, was auf eine physiologische Funktion von *Ku* für die Regulation des CYP11a1-Gens *in vivo* hindeutet.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass neben *Ku* auch Mitglieder der Sp-Transkriptionsfaktorfamilie an dasselbe GC-reiche Element des CYP11a1-Promoters binden. Zum Zeitpunkt E9.5 der Gehirnentwicklung waren insbesondere Sp4, nach der Geburt Sp1 und P450scc in vielen Bereichen des Gehirns ko-lokalisiert.

Somit wurden in dieser Arbeit neue Transkriptionsfaktoren identifiziert, die an der transkriptionellen Regulation des CYP11a1-Gens in Zellen glialen Ursprungs beteiligt sind und dadurch die Synthese von Neurosteroiden beeinflussen können.

## 6 Bibliographie

**Ahlgren, R., Simpson, E. R., Waterman, M. R. and Lund, J.** (1990). Characterization of the promoter/regulatory region of the bovine CYP11A (P-450<sub>sc</sub>) gene. Basal and cAMP-dependent expression. *J Biol Chem* **265**, 3313-9.

**Ahlgren, R., Suske, G., Waterman, M. R. and Lund, J.** (1999). Role of Sp1 in cAMP-dependent transcriptional regulation of the bovine CYP11A gene. *J Biol Chem* **274**, 19422-8.

**Bakalkin, G., Yakovleva, T., Hurd, Y. L., Nussenzweig, A., Li, G. C. and Terenius, L.** (1998). Autoantigen Ku in the brain. Developmentally regulated expression and subcellular localization. *Neuroreport* **9**, 2147-51.

**Bannister, A. J., Gottlieb, T. M., Kouzarides, T. and Jackson, S. P.** (1993). c-Jun is phosphorylated by the DNA-dependent protein kinase in vitro; definition of the minimal kinase recognition motif. *Nucleic Acids Res* **21**, 1289-95.

**Baulieu, E. E.** (1991). Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell* **71**, 3-10.

**Baulieu, E. E. and Robel, P.** (1990). Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol* **37**, 395-403.

**Beato, M.** (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335-44.

**Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. and Sweet, W.** (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**, 370-1.

**Bitran, D., Hilvers, R. J. and Kellogg, C. K.** (1991). Anxiolytic effects of 3 alpha-hydroxy-5 alpha[beta]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABAA receptor. *Brain Res* **561**, 157-61.

**Black, A. R., Jensen, D., Lin, S. Y. and Azizkhan, J. C.** (1999). Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *J Biol Chem* **274**, 1207-15.

**Black, S. M., Szklarz, G. D., Harikrishna, J. A., Lin, D., Wolf, C. R. and Miller, W. L.** (1993). Regulation of proteins in the cholesterol side-chain cleavage system in JEG-3 and Y-1 cells. *Endocrinology* **132**, 539-45.

**Blunt, T., Gell, D., Fox, M., Taccioli, G. E., Lehmann, A. R., Jackson, S. P. and Jeggo, P. A.** (1996). Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the scid mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10285-90.

**Brinton, R. D.** (1994). The neurosteroid 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one induces cytoarchitectural regression in cultured fetal hippocampal neurons. *J Neurosci* **14**, 2763-74.

**Brot, M. D., Akwa, Y., Purdy, R. H., Koob, G. F. and Britton, K. T.** (1997). The anxiolytic-like effects of the neurosteroid allopregnanolone: interactions with GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* **325**, 1-7.

**Brown, M. S., Goldstein, J. L., Krieger, M., Ho, Y. K. and Anderson, R. G.** (1979). Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J Cell Biol* **82**, 597-613.

**Chau, Y. M., Crawford, P. A., Woodson, K. G., Polish, J. A., Olson, L. M. and Sadovsky, Y.** (1997). Role of steroidogenic-factor 1 in basal and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated regulation of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the mouse. *Biol Reprod* **57**, 765-71.

**Chou, S. J., Lai, K. N. and Chung, B.** (1996). Characterization of the upstream sequence of the human CYP11A1 gene for cell type-specific expression. *J Biol Chem* **271**, 22125-9.

**Christy, B. and Nathans, D.** (1989). DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8737-41.

**Chung, B. C., Matteson, K. J., Voutilainen, R., Mohandas, T. K. and Miller, W. L.** (1986). Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8962-6.

**Clemens, J. W., Lala, D. S., Parker, K. L. and Richards, J. S.** (1994). Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology* **134**, 1499-508.

**Compagnone, N. A., Bulfone, A., Rubenstein, J. L. and Mellon, S. H.** (1995a). Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* **136**, 2689-96.

**Compagnone, N. A., Bulfone, A., Rubenstein, J. L. and Mellon, S. H.** (1995b). Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology* **136**, 5212-23.

**Compagnone, N. A. and Mellon, S. H.** (1998). Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4678-83.

**Concas, A., Mostallino, M. C., Porcu, P., Follesa, P., Barbaccia, M. L., Trabucchi, M., Purdy, R. H., Grisenti, P. and Biggio, G.** (1998). Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gamma-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13284-9.

**Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjoval, J. and Baulieu, E. E.** (1981). Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4704-7.

- Darnaudery, M., Pallares, M., Bouyer, J. J., Le Moal, M. and Mayo, W.** (1999). Infusion of neurosteroids into the rat nucleus basalis affects paradoxical sleep in accordance with their memory modulating properties. *Neuroscience* **92**, 583-8.
- Dennerstein, L., Spencer-Gardner, C., Gotts, G., Brown, J. B., Smith, M. A. and Burrows, G. D.** (1985). Progesterone and the premenstrual syndrome: a double blind crossover trial. *Br Med J (Clin Res Ed)* **290**, 1617-21.
- DuBois, R. N., Simpson, E. R., Kramer, R. E. and Waterman, M. R.** (1981). Induction of synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P- 450 by adrenocorticotropin in cultured bovine adrenocortical cells. *J Biol Chem* **256**, 7000-5.
- Durkee, T. J., McLean, M. P., Hales, D. B., Payne, A. H., Waterman, M. R., Khan, I. and Gibori, G.** (1992). P450(17 alpha) and P450SCC gene expression and regulation in the rat placenta. *Endocrinology* **130**, 1309-17.
- Dynan, W. S., Saffer, J. D., Lee, W. S. and Tjian, R.** (1985). Transcription factor Sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are simian virus 40 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4915-9.
- French-Mullen, J. M., Danks, P. and Spence, K. T.** (1994). Neurosteroids modulate calcium currents in hippocampal CA1 neurons via a pertussis toxin-sensitive G-protein-coupled mechanism. *J Neurosci* **14**, 1963-77.
- Flood, J. F., Morley, J. E. and Roberts, E.** (1992). Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1567-71.
- Flood, J. F., Morley, J. E. and Roberts, E.** (1995). Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: the amygdala is by far the most sensitive. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10806-10.
- Fried, M. and Crothers, D. M.** (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9**, 6505-25.
- Fuller, P. J.** (1991). The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *Faseb J* **5**, 3092-9.
- Galas, D. J. and Schmitz, A.** (1978). DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* **5**, 3157-70.
- Gallo, M. A. and Smith, S. S.** (1993). Progesterone withdrawal decreases latency to and increases duration of electrified prod burial: a possible rat model of PMS anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* **46**, 897-904.
- Gee, K. W.** (1988). Steroid modulation of the GABA/benzodiazepine receptor-linked chloride ionophore. *Mol Neurobiol* **2**, 291-317.

**Giffin, W., Kwast-Welfeld, J., Rodda, D. J., Prefontaine, G. G., Traykova-Andonova, M., Zhang, Y., Weigel, N. L., Lefebvre, Y. A. and Hache, R. J.** (1997). Sequence-specific DNA binding and transcription factor phosphorylation by Ku Autoantigen/DNA-dependent protein kinase. Phosphorylation of Ser- 527 of the rat glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **272**, 5647-58.

**Giffin, W., Torrance, H., Rodda, D. J., Prefontaine, G. G., Pope, L. and Hache, R. J.** (1996). Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription. *Nature* **380**, 265-8.

**Gollner, H., Bouwman, P., Mangold, M., Karis, A., Braun, H., Rohner, I., Del Rey, A., Besedovsky, H. O., Meinhardt, A., van den Broek, M. et al.** (2001). Complex phenotype of mice homozygous for a null mutation in the Sp4 transcription factor gene. *Genes Cells* **6**, 689-97.

**Gottlieb, T. M. and Jackson, S. P.** (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**, 131-42.

**Guarneri, P., Guarneri, R., Cascio, C., Pavasant, P., Piccoli, F. and Papadopoulos, V.** (1994). Neurosteroidogenesis in rat retinas. *J Neurochem* **63**, 86-96.

**Guo, I. C., Tsai, H. M. and Chung, B. C.** (1994). Actions of two different cAMP-responsive sequences and an enhancer of the human CYP11A1 (P450scc) gene in adrenal Y1 and placental JEG-3 cells. *J Biol Chem* **269**, 6362-9.

**Hagen, G., Muller, S., Beato, M. and Suske, G.** (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* **20**, 5519-25.

**Hagen, G., Muller, S., Beato, M. and Suske, G.** (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* **13**, 3843-51.

**Hammer, G. D. and Ingraham, H. A.** (1999). Steroidogenic factor-1: its role in endocrine organ development and differentiation. *Front Neuroendocrinol* **20**, 199-223.

**Han, I. and Kudlow, J. E.** (1997). Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* **17**, 2550-8.

**Hanukoglu, I., Gutfinger, T., Haniu, M. and Shively, J. E.** (1987). Isolation of a cDNA for adrenodoxin reductase (ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase). Implications for mitochondrial cytochrome P-450 systems. *Eur J Biochem* **169**, 449-55.

**Hanukoglu, I., Suh, B. S., Himmelhoch, S. and Amsterdam, A.** (1990). Induction and mitochondrial localization of cytochrome P450scc system enzymes in normal and transformed ovarian granulosa cells. *J Cell Biol* **111**, 1373-81.

**Harrison, N. L. and Simmonds, M. A.** (1984). Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* **323**, 287-92.

- Hu, Z. Y., Bourreau, E., Jung-Testas, I., Robel, P. and Baulieu, E. E.** (1987). Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8215-9.
- Isaacson, R. L., Varner, J. A., Baars, J. M. and De Wied, D.** (1995). The effects of pregnenolone sulfate and ethylestrenol on retention of a passive avoidance task. *Brain Res* **689**, 79-84.
- Jackson, S. P., MacDonald, J. J., Lees-Miller, S. and Tjian, R.** (1990). GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* **63**, 155-65.
- Jackson, S. P. and Tjian, R.** (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* **55**, 125-33.
- Jiang, N., Chopp, M., Stein, D. and Feit, H.** (1996). Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res* **735**, 101-7.
- Johansson, I. M., Birzniece, V., Lindblad, C., Olsson, T. and Backstrom, T.** (2002). Allopregnanolone inhibits learning in the Morris water maze. *Brain Res* **934**, 125-31.
- John, M. E., John, M. C., Boggaram, V., Simpson, E. R. and Waterman, M. R.** (1986). Transcriptional regulation of steroid hydroxylase genes by corticotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4715-9.
- Jung-Testas, I., Hu, Z. Y., Baulieu, E. E. and Robel, P.** (1989). Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology* **125**, 2083-91.
- Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R. and Tjian, R.** (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**, 1079-90.
- Keeney, D. S., Ikeda, Y., Waterman, M. R. and Parker, K. L.** (1995). Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 gene expression in the primitive gut of the mouse embryo does not require steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol* **9**, 1091-8.
- Kimonides, V. G., Khatibi, N. H., Svendsen, C. N., Sofroniew, M. V. and Herbert, J.** (1998). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1852-7.
- Kimura, T. and Suzuki, K.** (1967). Components of the electron transport system in adrenal steroid hydroxylase. Isolation and properties of non-heme iron protein (adrenodoxin). *J Biol Chem* **242**, 485-91.
- Kingsley, C. and Winoto, A.** (1992). Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* **12**, 4251-61.

**Klug, J.** (1997). Ku autoantigen is a potential major cause of nonspecific bands in electrophoretic mobility shift assays. *Biotechniques* **22**, 212-4, 216.

**Koenig, H. L., Schumacher, M., Ferzaz, B., Thi, A. N., Ressouches, A., Guennoun, R., Jung-Testas, I., Robel, P., Akwa, Y. and Baulieu, E. E.** (1995). Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* **268**, 1500-3.

**Kohchi, C., Ukena, K. and Tsutsui, K.** (1998). Age- and region-specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes p450scc, P450c17 and 3beta-HSD in the postnatal rat brain. *Brain Res* **801**, 233-8.

**Kramer, R. E., Rainey, W. E., Funkenstein, B., Dee, A., Simpson, E. R. and Waterman, M. R.** (1984). Induction of synthesis of mitochondrial steroidogenic enzymes of bovine adrenocortical cells by analogs of cyclic AMP. *J Biol Chem* **259**, 707-13.

**Lala, D. S., Rice, D. A. and Parker, K. L.** (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* **6**, 1249-58.

**Lambert, J. J., Peters, J. A., Sturgess, N. C. and Hales, T. G.** (1990). Steroid modulation of the GABAA receptor complex: electrophysiological studies. *Ciba Found Symp* **153**, 56-71; discussion 71-82.

**Lapchak, P. A., Chapman, D. F., Nunez, S. Y. and Zivin, J. A.** (2000). Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA(A) receptors. *Stroke* **31**, 1953-6; discussion 1957.

**Le Goascogne, C., Robel, P., Guezou, M., Sananes, N., Baulieu, E. E. and Waterman, M.** (1987). Neurosteroids: cytochrome P-450scc in rat brain. *Science* **237**, 1212-5.

**Lerner, L. E., Gribanova, Y. E., Whitaker, L., Knox, B. E. and Farber, D. B.** (2002). The rod cGMP-phosphodiesterase beta-subunit promoter is a specific target for Sp4 and is not activated by other Sp proteins or CRX. *J Biol Chem* **277**, 25877-83.

**Liu, Z. and Simpson, E. R.** (1997). Steroidogenic factor 1 (SF-1) and SP1 are required for regulation of bovine CYP11A gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells. *Mol Endocrinol* **11**, 127-37.

**Liu, Z. and Simpson, E. R.** (1999). Molecular mechanism for cooperation between Sp1 and steroidogenic factor-1 (SF-1) to regulate bovine CYP11A gene expression. *Mol Cell Endocrinol* **153**, 183-96.

**Luo, X., Ikeda, Y. and Parker, K. L.** (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* **77**, 481-90.

- Majello, B., De Luca, P. and Lania, L.** (1997). Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J Biol Chem* **272**, 4021-6.
- Majewska, M. D.** (1992). Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* **38**, 379-95.
- Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L. and Paul, S. M.** (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* **232**, 1004-7.
- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F. and Philipson, S.** (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* **89**, 619-28.
- Marsh, J. M.** (1976). The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. *Biol Reprod* **14**, 30-53.
- Mathis, C., Vogel, E., Cagniard, B., Criscuolo, F. and Ungerer, A.** (1996). The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks deficits induced by a competitive NMDA antagonist in active avoidance and lever-press learning tasks in mice. *Neuropharmacology* **35**, 1057-64.
- Matteson, K. J., Chung, B. C., Urdea, M. S. and Miller, W. L.** (1986). Study of cholesterol side-chain cleavage (20,22 desmolase) deficiency causing congenital lipid adrenal hyperplasia using bovine-sequence P450scc oligodeoxyribonucleotide probes. *Endocrinology* **118**, 1296-305.
- Maurice, T., Su, T. P. and Privat, A.** (1998). Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35- amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience* **83**, 413-28.
- Mayo, W., Dellu, F., Robel, P., Cherkaoui, J., Le Moal, M., Baulieu, E. E. and Simon, H.** (1993). Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Res* **607**, 324-8.
- Mellon, S. H. and Deschepper, C. F.** (1993). Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res* **629**, 283-92.
- Merante, F., Altamentova, S. M., Mickle, D. A., Weisel, R. D., Thatcher, B. J., Martin, B. M., Marshall, J. G., Tumati, L. C., Cowan, D. B. and Li, R. K.** (2002). The characterization and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension. *Mol Cell Biochem* **229**, 73-83.
- Meziane, H., Mathis, C., Paul, S. M. and Ungerer, A.** (1996). The neurosteroid pregnenolone sulfate reduces learning deficits induced by scopolamine and has promnesic effects in mice performing an appetitive learning task. *Psychopharmacology (Berl)* **126**, 323-30.

- Miller, W. L.** (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* **9**, 295-318.
- Mimori, T., Akizuki, M., Yamagata, H., Inada, S., Yoshida, S. and Homma, M.** (1981). Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* **68**, 611-20.
- Mimori, T. and Hardin, J. A.** (1986). Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* **261**, 10375-9.
- Momoi, K., Waterman, M. R., Simpson, E. R. and Zanger, U. M.** (1992). 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent transcription of the CYP11A (cholesterol side chain cleavage cytochrome P450) gene involves a DNA response element containing a putative binding site for transcription factor Sp1. *Mol Endocrinol* **6**, 1682-90.
- Morales, A., Cuellar, A., Ramirez, J., Vilchis, F. and Diaz-Sanchez, V.** (1999). Synthesis of steroids in pancreas: evidence of cytochrome P-450<sub>scc</sub> activity. *Pancreas* **19**, 39-44.
- Moran, M. H. and Smith, S. S.** (1998). Progesterone withdrawal I: pro-convulsant effects. *Brain Res* **807**, 84-90.
- Morel, Y., Picado-Leonard, J., Wu, D. A., Chang, C. Y., Mohandas, T. K., Chung, B. C. and Miller, W. L.** (1988). Assignment of the functional gene for human adrenodoxin to chromosome 11q13----qter and of adrenodoxin pseudogenes to chromosome 20cen----q13.1. *Am J Hum Genet* **43**, 52-9.
- Morfin, R., Young, J., Corpechot, C., Egestad, B., Sjøvall, J. and Baulieu, E. E.** (1992). Neurosteroids: pregnenolone in human sciatic nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6790-3.
- Morisaki, M., Duque, C., Ikekawa, N. and Shikita, M.** (1980). Substrate specificity of adrenocortical cytochrome P-450<sub>scc</sub>-I. Effect of structural modification of cholesterol side-chain on pregnenolone production. *J Steroid Biochem* **13**, 545-50.
- Morohashi, K., Sogawa, K., Omura, T. and Fujii-Kuriyama, Y.** (1987). Gene structure of human cytochrome P-450(SCC), cholesterol desmolase. *J Biochem (Tokyo)* **101**, 879-87.
- Morrell, M. J.** (1999). Epilepsy in women: the science of why it is special. *Neurology* **53**, S42-8.
- Morrow, A. L., Suzdak, P. D. and Paul, S. M.** (1987). Steroid hormone metabolites potentiate GABA receptor-mediated chloride ion flux with nanomolar potency. *Eur J Pharmacol* **142**, 483-5.
- Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M. C. and Li, G. C.** (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* **382**, 551-5.

- Ogata, T., Nakamura, Y., Tsuji, K., Shibata, T. and Kataoka, K.** (1993). Steroid hormones protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Neuroscience* **55**, 445-9.
- Oonk, R. B., Parker, K. L., Gibson, J. L. and Richards, J. S.** (1990). Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450scc) gene. Structure and regulation by cAMP in vitro. *J Biol Chem* **265**, 22392-401.
- Orme-Johnson, N. R.** (1990). Distinctive properties of adrenal cortex mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1020**, 213-31.
- Ouyang, H., Nussenzweig, A., Kurimasa, A., Soares, V. C., Li, X., Cordon-Cardo, C., Li, W., Cheong, N., Nussenzweig, M., Iliakis, G. et al.** (1997). Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination In vivo. *J Exp Med* **186**, 921-9.
- Pallares, M., Darnaudery, M., Day, J., Le Moal, M. and Mayo, W.** (1998). The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the nucleus basalis increases both acetylcholine release in the frontal cortex or amygdala and spatial memory. *Neuroscience* **87**, 551-8.
- Papadopoulos, V., Guarneri, P., Kreuger, K. E., Guidotti, A. and Costa, E.** (1992). Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5113-7.
- Paul, S. M. and Purdy, R. H.** (1992). Neuroactive steroids. *Faseb J* **6**, 2311-22.
- Petratos, S., Hirst, J. J., Mendis, S., Anikijenko, P. and Walker, D. W.** (2000). Localization of p450scc and 5alpha-reductase type-2 in the cerebellum of fetal and newborn sheep. *Brain Res Dev Brain Res* **123**, 81-6.
- Philipsen, S. and Suske, G.** (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* **27**, 2991-3000.
- Prince, R. J. and Simmonds, M. A.** (1992). Steroid modulation of the strychnine-sensitive glycine receptor. *Neuropharmacology* **31**, 201-5.
- Rabbitts, T. H.** (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372**, 143-9.
- Reddy, S. V., Alcantara, O. and Boldt, D. H.** (1998). Analysis of DNA binding proteins associated with hemin-induced transcriptional inhibition. The hemin response element binding protein is a heterogeneous complex that includes the Ku protein. *Blood* **91**, 1793-801.
- Reeves, W. H.** (1985). Use of monoclonal antibodies for the characterization of novel DNA-binding proteins recognized by human autoimmune sera. *J Exp Med* **161**, 18-39.
- Reeves, W. H. and Stoeber, Z. M.** (1989). Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J Biol Chem* **264**, 5047-52.

**Rice, D. A., Kirkman, M. S., Aitken, L. D., Mouw, A. R., Schimmer, B. P. and Parker, K. L.** (1990). Analysis of the promoter region of the gene encoding mouse cholesterol side-chain cleavage enzyme. *J Biol Chem* **265**, 11713-20.

**Robel, P., Synguelakis, M., Halberg, F. and Baulieu, E. E.** (1986). [Persistence of the circadian rhythm of dehydroepiandrosterone in the brain, but not in the plasma, of castrated and adrenalectomized rats]. *C R Acad Sci III* **303**, 235-8.

**Roberts, M. R., Han, Y., Fienberg, A., Hunihan, L. and Ruddle, F. H.** (1994). A DNA-binding activity, TRAC, specific for the TRA element of the transferrin receptor gene copurifies with the Ku autoantigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6354-8.

**Rodgers, R. J. and Johnson, N. J.** (1998). Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **59**, 221-32.

**Rodriguez, H., Hum, D. W., Staels, B. and Miller, W. L.** (1997). Transcription of the human genes for cytochrome P450sc and P450c17 is regulated differently in human adrenal NCI-H295 cells than in mouse adrenal Y1 cells. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 365-71.

**Rohlf, C., Ahmad, S., Borellini, F., Lei, J. and Glazer, R. I.** (1997). Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **272**, 21137-41.

**Roof, R. L., Duvdevani, R., Heyburn, J. W. and Stein, D. G.** (1996). Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Exp Neurol* **138**, 246-51.

**Roos, M. D., Su, K., Baker, J. R. and Kudlow, J. E.** (1997). O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol* **17**, 6472-80.

**Rupprecht, R. and Holsboer, F.** (1999). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* **22**, 410-6.

**Sadovsky, Y., Crawford, P. A., Woodson, K. G., Polish, J. A., Clements, M. A., Tourtellotte, L. M., Simburger, K. and Milbrandt, J.** (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10939-43.

**Saffer, J. D., Jackson, S. P. and Annarella, M. B.** (1991). Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* **11**, 2189-99.

**Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.

**Sanne, J. L. and Krueger, K. E.** (1995). Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 beta- hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J Neurochem* **65**, 528-36.

- Selye, H.** (1941). The anesthetic effects of steroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med* **46**, 106–12.
- Seybert, D. W., Lancaster, J. R., Jr., Lambeth, J. D. and Kamin, H.** (1979). Participation of the membrane in the side chain cleavage of cholesterol. Reconstitution of cytochrome P-450<sub>scc</sub> into phospholipid vesicles. *J Biol Chem* **254**, 12088-98.
- Shieh, B., Schultz, J., Guinness, M. and Lacy, J.** (1997). Regulation of the human IgE receptor (Fc epsilonRII/CD23) by Epstein- Barr virus (EBV): Ku autoantigen binds specifically to an EBV- responsive enhancer of CD23. *Int Immunol* **9**, 1885-95.
- Shikita, M. and Hall, P. F.** (1973). Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria: an enzyme for the side chain cleavage of cholesterol. II. Subunit structure. *J Biol Chem* **248**, 5605-9.
- Simon, R. P., Swan, J. H., Griffiths, T. and Meldrum, B. S.** (1984). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* **226**, 850-2.
- Smider, V., Rathmell, W. K., Lieber, M. R. and Chu, G.** (1994). Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. *Science* **266**, 288-91.
- Smith, S. S., Gong, Q. H., Hsu, F. C., Markowitz, R. S., French-Mullen, J. M. and Li, X.** (1998a). GABA(A) receptor alpha4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature* **392**, 926-30.
- Smith, S. S., Gong, Q. H., Li, X., Moran, M. H., Bitran, D., Frye, C. A. and Hsu, F. C.** (1998b). Withdrawal from 3alpha-OH-5alpha-pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABAA-gated current and increases the GABAA receptor alpha4 subunit in association with increased anxiety. *J Neurosci* **18**, 5275-84.
- Stocco, D. M.** (2001). Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol* **15**, 1245-54.
- Stromstedt, M. and Waterman, M. R.** (1995). Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Res Mol Brain Res* **34**, 75-88.
- Supp, D. M., Witte, D. P., Branford, W. W., Smith, E. P. and Potter, S. S.** (1996). Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev Biol* **176**, 284-99.
- Suske, G.** (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* **238**, 291-300.
- Taccioli, G. E., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A. R., Alt, F. W., Jackson, S. P. and Jeggo, P. A.** (1994). Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* **265**, 1442-5.

- Takase, M., Ukena, K., Yamazaki, T., Kominami, S. and Tsutsui, K.** (1999). Pregnenolone, pregnenolone sulfate, and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain and their seasonal changes. *Endocrinology* **140**, 1936-44.
- Taranenko, N. and Krause, D. S.** (2000). Regulation of CD34 transcription by Sp1 requires sites upstream and downstream of the transcription start site. *Exp Hematol* **28**, 974-84.
- Thomas, A. J., Nockels, R. P., Pan, H. Q., Shaffrey, C. I. and Chopp, M.** (1999). Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine* **24**, 2134-8.
- Turner, D. M., Ransom, R. W., Yang, J. S. and Olsen, R. W.** (1989). Steroid anesthetics and naturally occurring analogs modulate the gamma- aminobutyric acid receptor complex at a site distinct from barbiturates. *J Pharmacol Exp Ther* **248**, 960-6.
- Ukena, K., Usui, M., Kohchi, C. and Tsutsui, K.** (1998). Cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the cerebellar Purkinje neuron and its neonatal change in rats. *Endocrinology* **139**, 137-47.
- Urban, R. J. and Bodenbun, Y.** (1996). Transcriptional activation of the porcine P450 11A insulin-like growth factor response element in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* **271**, 31695-8.
- Usui, M., Yamazaki, T., Kominami, S. and Tsutsui, K.** (1995). Avian neurosteroids. II. Localization of a cytochrome P450scc-like substance in the quail brain. *Brain Res* **678**, 10-20.
- Uzunova, V., Sheline, Y., Davis, J. M., Rasmusson, A., Uzunov, D. P., Costa, E. and Guidotti, A.** (1998). Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3239-44.
- Valera, S., Ballivet, M. and Bertrand, D.** (1992). Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9949-53.
- Vallee, M., Mayo, W., Darnaudery, M., Corpechot, C., Young, J., Koehl, M., Le Moal, M., Baulieu, E. E., Robel, P. and Simon, H.** (1997). Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14865-70.
- Venepally, P. and Waterman, M. R.** (1995). Two Sp1-binding sites mediate cAMP-induced transcription of the bovine CYP11A gene through the protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem* **270**, 25402-10.
- Wang, J., Satoh, M., Pierani, A., Schmitt, J., Chou, C. H., Stunnenberg, H. G., Roeder, R. G. and Reeves, W. H.** (1994). Assembly and DNA binding of recombinant Ku (p70/p80) autoantigen defined by a novel monoclonal antibody specific for p70/p80 heterodimers. *J Cell Sci* **107** ( Pt 11), 3223-33.

**Watzka, M., Bidlingmaier, F., Schramm, J., Klingmuller, D. and Stoffel-Wagner, B.** (1999). Sex- and age-specific differences in human brain CYP11A1 mRNA expression. *J Neuroendocrinol* **11**, 901-5.

**Willis, D. M., Loewy, A. P., Charlton-Kachigian, N., Shao, J. S., Ornitz, D. M. and Towler, D. A.** (2002). Regulation of osteocalcin gene expression by a novel ku antigen transcription factor complex. *J Biol Chem* **277**, 37280-91.

**Zhang, P., Hammer, F., Bair, S., Wang, J., Reeves, W. H. and Mellon, S. H.** (1999). Ku autoimmune antigen is involved in placental regulation of rat P450c17 gene transcription. *DNA Cell Biol* **18**, 197-208.

**Zhang, P., Rodriguez, H. and Mellon, S. H.** (1995). Transcriptional regulation of P450scc gene expression in neural and steroidogenic cells: implications for regulation of neurosteroidogenesis. *Mol Endocrinol* **9**, 1571-82.

**Zhu, C., Bogue, M. A., Lim, D. S., Hasty, P. and Roth, D. B.** (1996). Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* **86**, 379-89.

**Zwain, I. H. and Yen, S. S.** (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* **140**, 3843-52.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP   | 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (Allopregnanolon)               |
| 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THDOC | 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-21-diol-20-on (Allodeoxycorticosteron) |
| A                             | Adenin   |
| ACTH                          | Adrenocorticotropes Hormon   |
| APS                           | Ammoniumpersulfat  |
| AS                            | Gegensinn ( <i>antisense</i> )   |
| ATP                           | Adenosintriphosphat  |
| bp                            | Basenpaar  |
| BSA                           | Bovines Serumalbumin   |
| c                             | Kohlenstoff  |
| C                             | Celsius  |
| C                             | Cytosin  |
| cAMP                          | Zyklisches Adenosinmonophosphat  |
| Ci                            | Curie  |
| Cl                            | Chlorid  |
| cpm                           | Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )                               |
| Da                            | Dalton   |
| DHEA                          | Dehydroepiandrosteron  |
| DHEAS                         | Dehydroepiandrosteron-sulfat   |
| DNA                           | Desoxyribonukleinsäure   |
| DNA-PK <sub>CS</sub>          | Katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Kinase                            |
| DNase I                       | Desoxyribonuklease I   |
| dNTP                          | Desoxynukleotidtriphosphat   |
| DTT                           | Dithiothreitol   |
| E                             | Tag der Embryonalentwicklung   |
| EDTA                          | Ethylendiamintetraacetat   |
| EMSA                          | Elektrophoretische Gelretentionsanalyse  |
| g                             | Gramm  |
| g                             | Gravitationskonstante  |
| G                             | Guanin   |
| GABA                          | $\gamma$ -Aminobuttersäure   |
| GR                            | Glucocorticoidrezeptor   |

|                     |   |
|---------------------|---|
| h                   | Stunde  |
| HDL                 | Lipoprotein hoher Dichte ( <i>high density lipoprotein</i> )      |
| HEPES               | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulphonische Säure            |
| HPLC                | High pressure liquid chromatography                               |
| HSP                 | Hitzeschockprotein  |
| kDa                 | Kilo-Dalton   |
| K                   | Kalium  |
| kb                  | Kilobasen   |
| l                   | Liter   |
| LDL                 | Lipoprotein niedriger Dichte ( <i>low density lipoprotein</i> )   |
| LH                  | Luteinisierendes Hormon   |
| mA                  | Milliampere   |
| Mg                  | Magnesium   |
| MR                  | Mineralocorticoidrezeptor   |
| mRNA                | <i>Messenger</i> Ribonukleinsäure                                 |
| N                   | <i>Nervus</i>   |
| Na                  | Natrium   |
| NADP                | Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat                           |
| ng                  | Nanogramm   |
| nm                  | Nanometer   |
| nM                  | Nanomol   |
| NMDA                | <i>N</i> -methyl-D-aspartat                                       |
| NRS                 | Hasenserum vor Immunisierung ( <i>non immune rabbit serum</i> )   |
| OD                  | Optische Dichte   |
| PBS                 | Phosphat-gepufferte Salzlösung                                    |
| PCR                 | Polymerase Kettenreaktion   |
| pg                  | Pikogramm   |
| pH                  | Negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration |
| pmol                | Pikomol   |
| P450 <sub>scc</sub> | P450 <i>side chain cleavage</i> Enzym                             |
| PK                  | Proteinkinase   |
| PKA                 | Proteinkinase A   |
| PK <sub>CS</sub>    | Katalytische Untereinheit der Proteinkinase                       |
| PMS                 | Prämenstruelles Syndrom   |
| PMSF                | Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid                                    |
| PNS                 | Peripheres Nervensystem   |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|        |   |
|--------|---|
| PPD    | Postpartale Depression                                    |
| PR     | Progesteronrezeptor                                       |
| PREG   | Pregnenolon   |
| PREGS  | Pregnenolon-Sulfat  |
| PROG   | Progesteron   |
| PROGS  | Progesteron-Sulfat  |
| RNA    | Ribonukleinsäure  |
| RT     | Raumtemperatur  |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase Kettenreaktion                      |
| S      | Sinn  |
| Sek    | Sekunde   |
| SD     | Standartabweichung  |
| SDS    | Natriumdodecylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )      |
| snRNA  | Kleine nukleäre ( <i>small nuclear</i> ) Ribonukleinsäure |
| SSRI   | Selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer                   |
| T      | Thymin  |
| TBE    | Trisboratsäure-EDTA                                       |
| Tris   | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                            |
| tRNA   | Transfer Ribonukleinsäure                                 |
| U      | Einheit ( <i>unit</i> )                                   |
| UV     | Ultraviolett  |
| V      | Volumen   |
| V      | Volt  |
| V(D)J  | Variable diversity joining                                |
| w      | Gewicht ( <i>weight</i> )                                 |
| W      | Watt  |
| µg     | Mikrogramm  |
| µl     | Mikroliter  |
| µm     | Mikrometer  |
| µmol   | Mikromol  |
| ZNS    | Zentralnervensystem                                       |

## 8 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1 Diagramm der Neurosteroidogenese .....                                   | 1  |
| Abbildung 2 Wirkungsweise von Steroidhormonen .....                                  | 6  |
| Abbildung 3 Biochemische Konversion von Cholesterin zu Pregnenolon .....             | 12 |
| Abbildung 4 Sequenz des 5' flankierenden Bereichs des CYP11a1-Gens .....             | 19 |
| Abbildung 5 Karte des chimären -190 bp-P450scc-Luciferase-Plasmids .....             | 38 |
| Abbildung 6 Karte des P450scc-p36-Luciferase-Plasmids. ....                          | 40 |
| Abbildung 7 Gelretentionsanalyse der -130/-94 Region mit C6-Proteinextrakt .....     | 47 |
| Abbildung 8 Gelretentionsanalyse der Ammoniumsulfatfraktionen.....                   | 48 |
| Abbildung 9 Gelretentionsanalyse der Mono-Q-Fractionen.....                          | 49 |
| Abbildung 10 Analyse der Mono-Q-Fractionen #27-34 .....                              | 50 |
| Abbildung 11 Der <i>Ku</i> -Komplex bindet an die -130/-94 Region .....              | 52 |
| Abbildung 12 <i>Ku</i> transaktiviert den P450scc-Promoter .....                     | 53 |
| Abbildung 13 Ko-Lokalisation von P450scc und <i>Ku</i> in E18.5 Mäuseembryonen ..... | 55 |
| Abbildung 14 Weitere C6-Proteine binden ebenfalls an die -130/-94 Region.....        | 57 |
| Abbildung 15 Expression von P450scc und Sp-Proteinen in Mäuseembryonen .....         | 58 |
| Abbildung 16 Ko-Lokalisation von P450scc und Sp1 .....                               | 59 |
| Abbildung 17 DNase I Footprint der -230/-130 Region von CYP11a1 .....                | 61 |
| Abbildung 18 Schematische Darstellung der -230/-130 Region.....                      | 61 |
| Abbildung 19 Kompetitions-Gelretentionsanalyse der -220/-200 Region .....            | 63 |
| Abbildung 20 Kompetitions-Gelretentionsanalyse der -183/-165 Region .....            | 64 |
| Abbildung 21 Transkriptionelle Aktivität der -220/-165 Region.....                   | 65 |
| Abbildung 22 Transkriptionelle Aktivität von CYP11a1-Deletionsmutanten .....         | 66 |

## 9 Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1 Auflistung der subklonierten Oligonukleotide .....                | 39 |
| Tabelle 2 Vergleich der -130/-94 Region mit Sp-/EGR-Konsensussequenzen..... | 46 |
| Tabelle 3 Blastanalyse des ansequenzierten Proteins.....                    | 51 |
| Tabelle 4 Bindungssequenzen von <i>Ku</i> .....                             | 71 |

# Danksagung

Frau Prof. Synthia Mellon gilt mein aufrichtiger und herzlicher Dank für ihre fachliche und vor allem auch persönliche Unterstützung, für viele hilfreiche Diskussionen und die intensive Betreuung während meines Forschungsaufenthaltes in ihrem Labor an der Universität von Kalifornien in San Francisco und danach. Darüber hinaus möchte ich insbesondere Frau Susanna Bair und Frau Dr. Nathalie Compagnone für die Einführung in die Techniken der Molekular-Biologie, Herrn Dr. Jean-Louis Vigne für seine Unterstützung und Anregungen bei der Proteinisolierung und Frau Phuong Hoang für ihre technische Unterstützung danken. Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. Emily Slater und Herrn Dr. Hartmut Hesse, die den Kontakt zu Frau Prof. Mellon herstellten und damit die Voraussetzung für meinen Forschungsaufenthalt schufen. Herrn Maurice Lahde danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn Prof. Bruno Allolio danke ich sehr herzlich für seine hilfreichen Anregungen, Diskussionen und die Supervision dieser Arbeit. Ihm als auch Frau PD Dr. Wiebke Arlt möchte ich darüber hinaus für ihre intensive wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung, insbesondere aber auch für die unermüdliche Vermittlung ihrer exzellenten klinischen Fähigkeiten, vor allem im Bereich der Endokrinologie, ganz herzlich danken.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Dr. Heinz und Mechtild Hammer, sowie meinen Großeltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung aller Aktivitäten und Reisen während meines Studiums.

# Curriculum vitae

## Persönliche Daten

*Name* Fabian Hammer  
*Geburtstag* 4. September 1972  
*Geburtsort* Marktheidenfeld

## Schulbildung

1979-1983 Grundschule Gensingen, Gensingen  
1983-1989 Leininger Gymnasium, Grünstadt  
1989-1992 Gymnasium Lilienthal, Lilienthal  
1992 Abitur

## Zivildienst

8/92 - 10/93 Hand- & Kieferchirurgischer OP, ZKH St.-Jürgen-Str., Bremen

## Studium

10/93 - 9/96 Studium der Humanmedizin, Philipps Universität, Marburg  
9/95 Ärztliche Vorprüfung  
8/96 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/96 Wechsel an die Freie Universität Berlin  
10/97 - 4/99 Doktorarbeit, University of California, San Francisco, U.S.A.  
4/00 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
7/01 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Praktisches Jahr

4/00 – 8/00 Innere Medizin (Kardiologie), Krankenhaus am Urban, Berlin  
9/00 – 11/00 Allgemeinchirurgie, Auguste-Viktoria Krankenhaus, Berlin  
11/00 – 3/01 Pädiatrie, Groote Schuur Hospital, Kapstadt, Südafrika

## Promotion

10/97 - 4/99 Durchführung der Experimente zum Thema "Regulation und Expression von P450SCC im Nervensystem" in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Synthia H. Mellon, Ph.D., Reproductive Endocrinology, University of California, San Francisco, U.S.A.

## Berufliche Tätigkeit

seit 10/01 Arzt im Praktikum, Medizinische Universitätsklinik Würzburg

Würzburg, 12. Februar 2003