

**Die Wirkung von Melatonin auf den Androgenrezeptor
in experimentellen Modellen von
spinaler und bulbärer Muskelatrophie**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologin Manuela Evelin Ritz

aus

Stuttgart

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer
Referent: Prof. Dr. Andrew C. B. Cato
Korreferent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer
Tag der mündlichen Prüfung: 6. Februar 2012

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation eigenständig angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet. Die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis habe ich in der gültigen Fassung beachtet.

Manuela Evelin Ritz
(Diplom-Biologin)

Karlsruhe, 9. Januar 2012

Zusammenfassung

Spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA) ist eine von bislang neun bekannten neurodegenerativen Krankheiten, die auf eine pathologische Erweiterung eines Polyglutamin-Traktes (polyQ) in verschiedenen Proteinen zurückzuführen sind. Das betroffene Protein bei SBMA ist der Liganden-abhängige Androgenrezeptor (AR), dessen Polyglutamin-Sequenz von normalerweise 9-38 Glutaminresten auf 40 bis mehr als 60 polyQ ansteigt. Dies führt zu Fehlfaltung und Aggregation des Androgenrezeptors und zur Degeneration spezifischer Motorneuronen, was sich vor allem in lokomotorischen Störungen bei SBMA-Patienten äußert. Bislang gibt es noch keine Therapie für SBMA, jedoch konnte vor kurzem in einem *Drosophila*-Modell, welches den mutierten AR panneuronal exprimiert, gezeigt werden, dass das Hormon Melatonin die lokomotorischen Störungen des Fliegenmodells hemmen kann.

Ziel dieser Arbeit war es, ein SBMA *Drosophila*-Modell zu generieren, welches verschiedene AR-Konstrukte (den Wildtyp-AR, ARQ22, eine Deletionsmutante mit einem Glutaminrest, ARQ1, den polyQ-amplifizierten AR, ARQ65 und den Wildtyp-AR, in welchem durch Mutagenese die beiden Serinreste 424 und 514 durch Alanin ausgetauscht worden waren, was den Wildtyp-AR in einen pathologischen AR konvertierte, ARQ22dm) ausschließlich in Motorneuronen exprimiert. Die Effekte dieser AR-Konstrukte sowie die Wirkung von Melatonin auf die lokomotorischen Fähigkeiten und das Überleben der AR-transgenen Fliegen wurden eruiert. Darüber hinaus wurden zelluläre Systeme herangezogen, um die Mechanismen, über welche Melatonin auf den Androgenrezeptor wirkte, näher zu spezifizieren.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass die Motorneuron-spezifische Expression des Wildtyp-AR sowie ARQ1 im *Drosophila* Modell zu keinen Defekten führte, wohingegen sich die Expression von ARQ65 und ARQ22dm in Anwesenheit des AR-Liganden Dihydrotestosteron (DHT) in signifikant verminderter Lokomotion äußerte. Die Verabreichung von Melatonin negierte diesen SBMA-Phänotyp. In kultivierten Insektenzellen reduzierte ARQ65- und ARQ22dm-Expression die Zellviabilität signifikant, was ebenfalls durch Anwesenheit des Hormons Melatonin verhindert wurde. Die weitere Charakterisierung der Expression der AR-Konstrukte und der Effekte von Melatonin erfolgte in Säugerzellen. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression des polyQ-amplifizierten AR nach Behandlung mit DHT die Bildung großer makromolekularer Aggregate im Zytoplasma induzierte. Diese erreichten nach 6h DHT-Behandlung einen Durchmesser von 2,5 µm. Die Anzahl Aggregate-positiver Zellen wurde durch die Inkubation mit Melatonin signifikant reduziert. Des Weiteren verhinderte das Blockieren der wichtigen N- und C-terminalen Interaktion des Androgenrezeptors, welche den AR stabilisiert und transkriptionelle Steuerung ermöglicht, die Ausbildung makromolekularer Aggregate komplett. Dies lässt vermuten, dass N- und C-terminale Interaktionen zur Aggregation und Toxizität des AR beitragen. Anschließende Studien schlossen jedoch aus, dass die *Rescue*-Effekte von Melatonin über den Mechanismus der N/C-Interaktion vermittelt wurden, da Melatonin diese Interaktion nicht blockierte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Melatonin in verschiedenen experimentellen SBMA-Modellen den Effekten des pathologischen AR entgegenwirken konnte. Die hier präsentierten Studien schließen die N- und C-terminale Interaktion als Mechanismus aus, über welchen Melatonin auf den Androgenrezeptor Einfluss nahm.

Abstract

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is one of nine neurodegenerative diseases known to date which can be traced back to amplification of polyglutamine tracts (polyQ) in different proteins. In SBMA, the affected protein is the ligand-dependent androgen receptor (AR) whose polyQ tract comprises 9-38 glutamine residues in healthy individuals. In SBMA patients, the polyQ stretch is expanded to 40 and up to more than 60 polyQ though. This leads to misfolding and aggregation of the mutant androgen receptor protein causing the degeneration of specific motor neurons which elicits locomotor impairments in SBMA patients. To date, no therapy for SBMA is available. However, recently a *Drosophila* model which expressed the mutant AR panneuronally has shown that the hormone melatonin can restore the locomotor ability of these transgenic flies.

The aim of this work was to create an SBMA-specific *Drosophila* model with selective expression in motor neurons of different AR constructs (the wild type AR, ARQ22, a deletion mutant carrying one glutamine, ARQ1, the polyQ-amplified AR, ARQ65 and the wild type AR with two amino acid exchanges at serine residues 424 and 514 by exchanging them to alanine which was recently shown to confer toxicity to the wild type AR, ARQ22dm). The impact of these AR constructs and the effect of melatonin were analyzed in the AR-transgenic flies in locomotor and survival assays. Additionally, cellular systems were used to explore the mechanisms by which melatonin interferes with the AR action.

The results of this work showed that the motor neuron-specific expression of the wild type androgen receptor and ARQ1 did not lead to any defects in the *Drosophila* model whereas ARQ65 and ARQ22dm expression evoked a severe locomotor defect in the presence of the AR ligand dihydrotestosterone (DHT). This phenotype was rescued by the application of melatonin. In cultured insect cells, the expression of ARQ65 and ARQ22dm significantly decreased cell viability which was also inhibited by melatonin. Further characterization of the expression of the AR constructs and the effects of melatonin was performed in mammalian cells. The expression of the polyQ-expanded AR resulted in the appearance of large macromolecular aggregates in the cytoplasm of the cells. These aggregates reached sizes of 2.5 μm in diameter after 6 hours of DHT treatment. The number of aggregate-positive cells was significantly reduced by incubating the cells with melatonin. Furthermore, mutagenesis of the important N- and C-terminal interaction surface of the androgen receptor which stabilizes the AR and allows transcriptional regulation prevented the formation of the macromolecular aggregates. This suggests that N- and C-terminal interactions contribute to the aggregation and toxicity of the mutant receptors. However, subsequent studies revealed that the rescue effects of melatonin were not mediated via the N/C interaction of the AR as melatonin did not block this interaction.

In summary, the results of this work show that melatonin can interfere with the action of the pathologic AR insofar as it prevented experimental models of SBMA from toxic AR-induced defects. The studies presented here exclude N- and C-terminal interaction of the AR as basis of the rescue effect of melatonin.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungen	XI

Kapitel	Bezeichnung	Seite
1	Einleitung	1
1.1	Neurodegenerative Basentriplett-Erkrankungen	1
1.1.1	Allgemein: Basentriplett-Erkrankungen	1
1.1.2	Basentriplett-Wiederholungen im nicht-kodierenden Bereich der DNA	2
1.1.3	Basentriplett-Wiederholungen im kodierenden Bereich der DNA	2
1.2	Neurodegenerative Polyglutamin-Erkrankungen	3
1.3	SBMA – Eine neurodegenerative Polyglutamin-Erkrankung	5
1.3.1	Kennzeichen von SBMA	5
1.3.2	Ursachen von SBMA	6
1.4	Der Androgenrezeptor in Zusammenhang mit SBMA	7
1.4.1	Aufbau des Androgenrezeptor-Proteins	7
1.4.2	Aktivität des Androgenrezeptors	7
1.4.3	Transaktivierung des Androgenrezeptors	8
1.4.4	Auswirkungen der polyQ-Amplifikation auf den Androgenrezeptor	9
1.5	Aggregation toxischer polyQ-Proteine	10
1.5.1	Androgenrezeptor-Aggregate bei SBMA	10

1.6	Modellorganismen von SBMA	11
1.6.1	Zell-Modelle	11
1.6.2	Maus-Modelle	12
1.6.3	<i>Drosophila</i> -Modelle	14
1.7	Mögliche SBMA-Inhibitoren	15
1.7.1	Reduktion des Testosteron-Spiegels	16
1.7.2	Histondeacetylasen-Inhibitoren	18
1.7.3	Melatonin	19
1.7.3.1	Melatonin in Zusammenhang mit SBMA	19
1.8	Ziel der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Materialien	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3	Plasmide zur Expression in <i>Drosophila</i> zur Generierung sog. Effektorlinien	23
2.1.4	Weitere <i>Drosophila</i> -Linien	24
2.1.5	Verwendete Zelllinien	24
2.1.6	Plasmide zur Expression in <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) Zellen	25
2.1.7	Plasmide zur Expression in COS-7 Zellen	25
2.1.8	Antikörper	28
2.1.8.1	Primäre Antikörper	28
2.1.8.2	Sekundäre Antikörper	29
2.1.9	Enzyme	29
2.1.10	Messgeräte	30
2.1.11	Mikroskope	30
2.1.12	Computerprogramme	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	DNA-Klonierungen	31
2.2.1.1	Verdau mit Restriktionsenzymen	31
2.2.1.2	Elektrophoretische DNA-Separation mittels Agarose-Gel	31

2.2.1.3	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	32
2.2.1.4	Ligation von DNA-Fragmenten in Expressionsplasmide	33
2.2.1.5	Einbringen einer Aminosäure-Mutation in pSG5-Expressionsplasmide	33
2.2.1.6	Hybridisierung und Ligation zweier Oligonukleotid-Stränge	34
2.2.1.7	Quikchange®, Einbauort-gezielte Mutagenese	34
2.2.1.8	DNA-Transformation in kompetente Bakterien	35
2.2.1.9	Plasmid-Präparation geringer DNA-Mengen, sog. „Mini“-Präparation	36
2.2.1.10	Plasmid-Präparation großer DNA-Mengen, sog. „Maxi“-Präparation	37
2.2.2	<i>Drosophila</i>	38
2.2.2.1	Haltung der Fliegen	38
2.2.2.2	Herstellung von Fliegenfutter	38
2.2.2.3	Kreuzungen von Fliegen	39
2.2.2.4	Langzeit-Überlebensstudien	42
2.2.2.5	Lokomotionsstudien	42
2.2.2.6	Kurzzeit-Überlebensstudien	43
2.2.2.7	Herstellung von Proteinlysaten aus <i>Drosophila</i> -Köpfen	43
2.2.2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	44
2.2.2.9	Größenauftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE	44
2.2.2.10	Western Blot Analysen	45
2.2.2.11	Präparation von Fliegenlarven für anschließende immunhistochemische Färbung der neuromuskulären Verbindung	46
2.2.2.12	Immunohistochemische Färbung der neuromuskulären Verbindung von <i>Drosophila</i> -Larven	47
2.2.3	Zellkultur (<i>Spodoptera frugiperda</i>, Sf9)	49
2.2.3.1	Passagierung von Sf9 Zellen	49
2.2.3.2	Auftauen und Einfrieren von Sf9 Zellen	49
2.2.3.3	Infektion von Sf9 Zellen	50
2.2.3.4	Bestimmung der Wachstumsrate infizierter Sf9 Zellen	51
2.2.3.5	Ermittlung der Viabilität infizierter Sf9 Zellen nach Hormonbehandlung	52
2.2.3.6	Herstellung von Proteinlysaten für Western Blot Analysen	52
2.2.4	Zellkultur (COS-7)	54
2.2.4.1	Passagierung von COS-7 Zellen	54
2.2.4.2	Auftauen und Einfrieren von COS-7 Zellen	54
2.2.4.3	Transiente Transfektion von COS-7 Zellen	55

2.2.4.4	Fraktionierungen von COS-7 Zellen	56
2.2.4.5	Immunhistochemische Färbungen von COS-7 Zellen	57
2.2.4.6	Messung der Glühwürmchen-Luziferase-Aktivität transient transfizierter COS-7 Zellen	58
2.2.4.7	Messung der <i>Renilla</i> -Luziferase-Aktivität transient transfizierter COS-7 Zellen	59
2.2.5	Hormon-Bindestudie	60
3	Ergebnisse	62
3.1	<i>Drosophila</i> als Modellorganismus von SBMA	62
3.1.1	Langzeit-Überlebensstudien an AR-transgenen <i>Drosophila</i>	64
3.1.2	Kurzzeit-Überlebensstudien und Lokomotionsstudien an AR-transgenen <i>Drosophila</i>	67
3.1.3	Untersuchungen des Effekts von Melatonin auf den DHT-abhängigen Phänotyp AR-transgener <i>Drosophila</i>	71
3.1.4	Die Wirkungen von Melatonin-Analoga auf das Lokomotionsverhalten AR-transgener <i>Drosophila</i>	73
3.1.5	Morphologische Untersuchungen der neuromuskulären Verbindungen AR-transgener <i>Drosophila</i>	76
3.2	Expression des Androgenrezeptors in Insektenzellen mithilfe des Baculovirus-Expressionssystems	82
3.2.1	Ermittlung der Wachstumsrate AR-exprimierender Sf9 Zellen	83
3.2.2	Viabilität und Toxizität AR-exprimierender Sf9 Zellen	86
3.3	Expression des Androgenrezeptors in Säugerzellen	89
3.3.1	Wirkungen von Melatonin auf die Lokalisation und Aggregation des Androgenrezeptors	89
3.3.2	Wirkungen von Melatonin auf die subzelluläre Lokalisation des Androgenrezeptors	90
3.3.2.1	Zellfraktionierungen	91
3.3.2.2	Immunhistochemische Färbungen	94
3.3.3	Effekt von Melatonin auf die Aggregatbildung des Androgenrezeptors	99
3.3.4	Wirkung von Melatonin auf die Liganden-Bindedomäne des Androgenrezeptors	103

3.3.5	Effekt der N/C-Interaktion auf die Aggregation des Androgenrezeptors	105
4	Diskussion	110
4.1	Die Expression von ARQ65 und ARQ22dm führt zu lokomotorischen Defekten in AR-transgenen <i>Drosophila</i>	111
4.2	Die Morphologie der neuromuskulären Innervierung ARQ65- und ARQ22dm-exprimierender <i>Drosophila</i> ist verändert	114
4.3	Die Expression der pathologischen AR-Konstrukte reduziert die Zellviabilität	115
4.4	Die Expression von ARQ65 führt zur Formation makromolekularer Aggregate	116
4.4	Die Blockierung der N/C-terminalen AR-Interaktion verhindert die Ausbildung makromolekularer AR-Aggregate	119
4.6	Melatonin hemmt den DHT-abhängigen SBMA-Phänotyp	120
5	Literatur	124
	Danksagungen	147
	Curriculum Vitae	148

Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel	Seite
1.1	Schematische Darstellung des Androgenrezeptor-Proteins	7
2.1	Schematische Darstellung des UAS-GAL4-Systems zur ektopischen Expression humaner Transgene in definierten Geweben oder Zelltypen in <i>Drosophila</i>	40
3.1	Western Blot Analyse mit Proteinlysaten aus AR-transgenen <i>Drosophila</i>	64
3.2	Langzeit-Überlebensstudie weiblicher und männlicher AR-transgener ARQ22- und ARQ65-exprimierender <i>Drosophila</i>	66
3.3	Western Blot Analyse mit Proteinlysaten aus AR-transgenen <i>Drosophila</i>	68
3.4	Lokomotionsstudie AR-transgener <i>Drosophila</i> -Larven nach DHT-Behandlung	69
3.5	Kurzzeit-Überlebensstudie AR-transgener <i>Drosophila</i> nach DHT-Behandlung	70
3.6	Effekte von Melatonin auf die Lokomotionsfähigkeit und Überlebensrate AR-transgener <i>Drosophila</i>	72
3.7	Effekte der Melatonin-Agonisten 2-PM und 8-M-PDOT auf das Lokomotionsverhalten AR-transgener <i>Drosophila</i>	74
3.8	Effekt von 6-HM auf die Lokomotionsfähigkeit AR-transgener <i>Drosophila</i>	75
3.9	Morphologische Untersuchungen AR-transgener <i>Drosophila</i> im dritten Larvenstadium	79
3.10	Quantifizierungen der morphologischen Analysen AR-transgener <i>Drosophila</i>	81

3.11	Wachstumsrate AR-exprimierender Sf9 Zellen	84
3.12	Western Blot Analyse AR-exprimierender Sf9 Zellen	85
3.13	Ermittlung der Viabilität AR-exprimierender Sf9 Zellen nach Hormon- behandlung	87
3.14	Western Blot Analyse AR-exprimierender Sf9 Zellen nach Hormon- behandlung	88
3.15	Subzelluläre Fraktionierung ARQ22- und ARQ65-exprimierender COS-7 Zellen	93
3.16	Kategorisierung der subzellulären Lokalisation des AR nach Hormon- behandlung	95
3.17	Zeit- und Hormon-abhängige subzelluläre Lokalisation des AR	98
3.18	Analyse der Aggregatbildung AR-exprimierender COS-7 Zellen	102
3.19	Darstellung zweier fusionierender AR-Aggregate	102
3.20	Hormon-Bindestudie	104
3.21	<i>Mammalian Two-Hybrid</i> Studie zur Untersuchung der N/C-Interaktion des AR	107
3.22	Western Blot Analyse AR-exprimierender COS-7 Zellen	108

Tabellenverzeichnis

Tab.	Titel	Seite
1	Beispiele einiger Erkrankungen, die auf Basentriplett-Erweiterungen im nicht-kodierenden Bereich der DNA zurückgehen	2
2	Die Polyglutamin-Krankheiten	4

Abkürzungen

(NH₄)₂SO₄	Ammoniumsulfat
2-PM	2-Phenylmelatonin
8-M-PDOT	8-methoxy-2-propionamidotetralin
°C	Grad Celcius
A	Adenin
A	Alanin
Aβ	β-amyloid
Abb.	Abbildung
AF-1	<i>activation function-1</i>
AF-2	<i>activation-function-2</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen-responsive Elemente
BSA	Kalb-Serumalbumin
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CaM	Calmodulin
CCS	Aktivkohle-gefiltertes FCS
CMV	Cytomegalie-Virus
COOH	Carboxy-
DBD	DNA-Bindedomäne
ddest.	zweifach destilliert
d. h.	das heißt
DHT	5α-Dihydrotestosteron

DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ER	Östrogenrezeptor
ERE	<i>estrogen responsive element</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> ; und andere
F	Phenylalanin
FCS	Fötale Kalbserum
g	Gramm
G	Guanin
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
h	Stunde(n)
HAT	Histon-Acetyltransferase
HCl	Chlorwasserstoff
HD	<i>Huntington's Disease</i> ; Chorea Huntington
HDAC	Histon-Deacetyltransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettich-Peroxidase
i. d. R.	in der Regel
i. e.	<i>id est</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
insbes.	insbesondere
K	Lysin
K₃PO₄	Kaliumphosphat

kb	Kilobasen
kDa	kiloDalton
l	Liter
L	Leucin
LBD	Liganden-Bindedomäne
m	milli-
m	-meter
M	molar
μ	mikro-
mA	milli Ampère
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeOH	Methanol
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
n	nano-
N	Asparagin
N-Terminus	Amino-Terminus
NaCl	Natriumchlorid
NFL	<i>neurofilament light chain</i>
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaVO₃	Natriummetavanadat
NGS	<i>normal goat serum; Ziegenserum</i>
NH₂	Amino-
NLS	Nukleus-Lokalisationssignal
NSE	<i>neuron-specific enolase</i>
NTD	N-terminale Domäne
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit Tween-20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIC	Protease Inhibitor-Cocktail
polyA	Polyalanin
polyQ	Polyglutamin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Glutamin
RT	Raumtemperatur
SAHA	<i>Suberoylanilide Hydroxamic Acid</i>
sek	Sekunden
SBMA	Spinale und bulbäre Muskelatrophie
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TAE	Triacetat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TBS	PBS mit Triton X-100
techn.	technisch
TNR	<i>trinucleotide repeat</i>
TNRE	<i>trinucleotide repeat expansion</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>

UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht zu Volumen
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Basentriplett-Erkrankungen

1.1.1 Allgemein: Basentriplett-Erkrankungen

Vor etwa zwanzig Jahren wurde erstmals beschrieben, dass eine Reihe bestimmter humaner Erbkrankheiten in Erscheinung treten, die durch eine instabile, pathologisch erweiterte Wiederholung eines Basentriplets (*trinucleotide repeat expansion*, TNRE), das für eine bestimmte Aminosäure kodiert, in einem Protein gekennzeichnet sind (Fu *et al.*, 1991, La Spada *et al.*, 1991). Bislang sind mindestens 16 TNRE-Erkrankungen bekannt (s. Review Orr und Zoghbi, 2007). Die TNRE-Mutationen führen fast immer zu einem neurodegenerativen Phänotyp, der durch das selektive Absterben bestimmter Neuronenpopulationen hervorgerufen wird. Patienten mit Trinukleotid-Erkrankungen zeigen das Phänomen der Antizipation: durch Erweiterungen der TNRE tritt die Krankheit in nachfolgenden Generationen zunehmend früher und in schwererem Ausmaß auf (Igarashi *et al.*, 1992, Klockgether und Evert, 1998). Darüber hinaus bestimmt die Länge der Basentriplett-Erweiterung auch das Ausmaß der Neuropathologie und die Schwere des Krankheitsverlaufs (Review Hirth, 2010).

Die TNRE manifestieren sich entweder im kodierenden oder nicht-kodierenden Bereich des Gens, das für das jeweilige Protein kodiert und können anhand dieser Charakteristika unterteilt werden.

1.1.2 Basentriplett-Wiederholungen im nicht-kodierenden Bereich der DNA

Einige Basentriplett-Erkrankungen gehen auf erweiterte Basentriplets im nicht-kodierenden DNA-Bereich zurück und führen zum Verlust des betroffenen Proteins („*loss of function*“) (vgl. Reddy und Housman, 1997). Beispiele hierfür sind Fragiles X-Syndrom, Friedreich Ataxie und Myotone Dystrophie Typ 1 (Tab. 1). Die native Sequenzwiederholung von ca. 10-30 Basentriplett-Wiederholungen ist bei diesen Krankheiten auf 100-3000 erhöht (Palazzolo *et al.*, 2007, Review Brouwer *et al.*, 2009).

Krankheit	Basentriplett	Quellen
Fragiles X-Syndrom	CGG	Martin und Bell, 1943, Lubs, 1969, s. Review Raske und Hagerman, 2009
Friedreich Ataxie	GAA	Friedreich, 1863, Hart <i>et al.</i> , 1986, Campuzano <i>et al.</i> , 1996
Myotone Dystrophie Typ 1	CTG	Steinert, 1909, Curschmann, 1912 (vgl. Steinberg und Wagner, 2008), Brook <i>et al.</i> , 1992, Fu <i>et al.</i> , 1992

Tab. 1 Beispiele einiger Erkrankungen, die auf Basentriplett-Erweiterungen im nicht-kodierenden Bereich der DNA zurückgehen.

1.1.3 Basentriplett-Wiederholungen im kodierenden Bereich der DNA

Hierbei sind Krankheiten einzuordnen, welche durch eine pathologische Amplifikation Alanin- (polyA) oder Glutamin- (polyQ) kodierender Basentriplets im offenen Leserahmen hervorgerufen werden.

Zwischen polyA- und polyQ-Krankheiten bestehen einige grundlegende Unterschiede: Während Polyglutamin (polyQ)-Erkrankungen ausschließlich durch die Basenabfolge CAG kodiert werden, werden die einzelnen Alaninreste der polyA-Krankheiten teilweise von verschiedenen Basentriplets kodiert (Cleary and Pearson, 2005, Pearson *et al.*, 2005, aus Review Messaed und Rouleau, 2009). Eine weitere Sonderstellung nehmen polyA-Erkrankungen insofern ein, dass sie z. B. nicht Antizipation zeigen und die Länge des polyA-Traktes konstant bleibt und nicht in nachfolgenden Generationen zunimmt, wie es bei polyQ-Erkrankungen der Fall ist

(Cleary and Pearson, 2005, Pearson *et al.*, 2005, aus Review Messaed und Rouleau, 2009).

1.2 Neurodegenerative Polyglutamin-Erkrankungen

Allen polyQ-Krankheiten gemein ist die pathologische Amplifizierung der CAG-Basentriplett-Wiederholung im für das Protein kodierenden DNA-Bereich (Tab. 2).

Der pathologischen Amplifikation der CAG-Basentriplett-Wiederholungen (TNR, *trinucleotide repeats*) liegt sog. Mikrosatelliten-DNA zugrunde (Review Kovtun und McMurray, 2008, Review Brouwer *et al.*, 2009). Dabei handelt es sich um 10 bis ~100 Wiederholungen 1-5 Basenpaare langer Folgen (Bennett, 2000), welche direkt hintereinander vorkommen. Insbes. CAG-Basentriplett-Wiederholungen betreffend, können solche Mikrosatelliten-Insertionen durch Polymerase-*Slippage* („Verrutschen“) während der DNA-Replikation entstehen (Bennett, 2000). Dabei kommt es zu einer Fehlanlagerung der doppelsträngigen DNA aufgrund unvollständiger Okazaki-Fragment-Prozessierung (Otto *et al.*, 2001), was zur Formation einer sog. Haarnadel-Struktur führen kann (Petruska *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 2005 Bichara *et al.*, 2006 Mirkin, 2007, aus Delagroutte *et al.*, 2008); dadurch wird die Länge der TNR im Tochterstrang erweitert (Pearson *et al.*, 2005 Bichara *et al.*, 2006 Mirkin, 2007, aus Delagroutte *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010, aus Delagroutte und Baldacci, 2011). Normalerweise werden solche überschüssigen Basenpaare durch das post-replikative DNA-Diskrepanz-Reparatursystem (*DNA mismatch repair*) korrigiert (Otto *et al.*, 2001). Dieses ist jedoch dazu nicht mehr in der Lage, wenn die ungepaarten DNA-Schleifen mehr als 14 Basenpaare umfassen (Palombo *et al.*, 1996, aus Otto *et al.*, 2001). Ist erst einmal eine gewisse Krankheits-induzierende Anzahl an TNR vorhanden, werden die Wiederholungen sowohl in den Keimzellen, als auch in somatischen Zellen äußerst instabil (Richards, 2011, aus Gomes-Pereira *et al.*, 2004), und je länger die TNR-Amplifikation, desto leichter werden in Tochtergenerationen neue Basenpaar-Wiederholungen eingefügt, was sich dann im Phänotyp der Antizipation und einem altersmäßig früheren Ausbruch der Krankheit mit

schwerwiegenderen Symptomen äußert (Gomes-Pereira *et al.*, 2004, Nestor und Monckton, 2011).

Als erstes wurde die neurodegenerative polyQ-Erkrankung spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA) mit der pathologischen CAG-Basentriplett-Wiederholung in Verbindung gebracht (La Spada *et al.*, 1991). Anschließend konnten acht weitere polyQ-Krankheiten nachgewiesen werden: Huntington, Dentatorubrale Pallidoluysische Atrophie (DRPLA) und sechs verschiedene Spinocerebelläre Ataxien (SCA; SCA 1, 2, 3, 6, 7 und 17) (Tab. 2). Die einzelnen polyQ-Erkrankungen sind sehr selten, zusammengenommen stellen sie aber die am häufigsten vorkommende Form neurodegenerativer Krankheiten dar (Riley und Orr, 2006).

Krankheit	Betroffenes Protein	Normale CAG-Länge	Pathologische CAG-Länge	Quellen
DRPLA	Atrophin-1	7-35	49-88	Komure <i>et al.</i> , 1995
Huntington	Huntingtin	11-34	40-120	The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993, Nahhas <i>et al.</i> , 2005
SCA1	Ataxin-1	25-36	41-81	Matilla <i>et al.</i> , 1993, Ranum <i>et al.</i> , 1994
SCA2	Ataxin-2	15-24	35-59	Pulst <i>et al.</i> , 2005
SCA3	Ataxin-3	13-36	62-82	Kawaguchi <i>et al.</i> , 1994
SCA6	CACNA1A (1A-spannungsabhängiger Kalziumkanal)	4-16	21-27	Zhuchenko <i>et al.</i> , 1997
SCA7	Ataxin-7	4-19	37-306	David <i>et al.</i> , 1997, Benton <i>et al.</i> , 1998
SCA17	TATA-Box-Bindeprotein	25-42	47-63	Koide <i>et al.</i> , 1999, Nakamura <i>et al.</i> , 2001
SBMA	Androgenrezeptor	9-38	40-62	La Spada <i>et al.</i> , 1991

Tab. 2 Die Polyglutamin-Krankheiten (nach Reddy und Housman, 1997, Review Saunders und Bottomley, 2009).

Mit Ausnahme von SBMA werden alle polyQ-Erkrankungen dominant vererbt; alle manifestieren sich erst in mittleren Lebensjahren, d. h. zwischen dem dreißigsten und fünfzigsten Lebensjahr („*late onset diseases*“) (Gusella und McDonald, 2000, aus Nestor und Monckton, 2011). Allen gemeinsam ist, dass eine Wiederholung von mindestens 35 aufeinanderfolgenden Glutaminen einen pathologischen Phänotyp auslöst mit Ausnahme der Spinocerebellären Ataxie 6 (SCA6); hier führen bereits 21-27 polyQ zu einem neurodegenerativen Defekt (Zhuchenko *et al.*, 1997) (Tab. 2).

Huntington und SCA3 treten in der Gruppe der polyQ-Erkrankungen am häufigsten auf (Perutz, 1999), jedoch ist die Funktion des Androgenrezeptors in dieser Gruppe am meisten erforscht (Riley und Orr, 2006), sodass sich SBMA als Modell zur Erforschung neurodegenerativer Polyglutamin-Krankheiten mitunter am besten eignet.

1.3 SBMA - Eine neurodegenerative Polyglutamin-Erkrankung

Spinale und bulbäre Muskelatrophie wurde im Jahre 1968 erstmals durch den Arzt William R. Kennedy als X-chromosomal vererbte Krankheit beschrieben (Kennedy *et al.*, 1968) und wird daher auch Kennedy-Krankheit genannt. Später wurde das mutierte Androgenrezeptor-Gen bzw. -Protein als Krankheits-auslösende Ursache identifiziert (Migeon *et al.*, 1981, Brown *et al.*, 1989, La Spada *et al.*, 1992).

1.3.1 Kennzeichen von SBMA

Der Androgenrezeptor (AR) gesunder Individuen umfasst 9-38 Glutaminreste im N-terminalen Ende, am häufigsten weist er 18-25 polyQ auf (McLean *et al.*, 1996). Bei SBMA-Patienten hingegen findet man 40 bis 62 polyQ (La Spada *et al.*, 1991). Die Krankheit ist durch den fortschreitenden Verlust sensorischer und motorischer Neuronen, die hohe Level an Androgenrezeptor exprimieren (Fischbeck, 2001, Schmidt *et al.*, 2002, Adachi *et al.*, 2007, Palazzolo *et al.*, 2008, Kerkhofs *et al.*, 2009, aus

Review Kumar *et al.*, 2011), gekennzeichnet, wodurch Schwächungen und Atrophien proximaler Muskeln hervorgerufen werden (Sobue *et al.*, 1989).

Die Atrophien beginnen meist in den Hüften, weiten sich auf die Schultern aus und betreffen schließlich Muskeln, die vom Hirnstamm innerviert werden (bulbäre Muskeln). Dies führt zu Problemen beim Gehen, Sprechen, Schlucken und Atmen (Kennedy *et al.*, 1968, Fischbeck, 1997); respiratorische Insuffizienz stellt einen der Hauptgründe für das frühzeitige Sterben von SBMA-Patienten dar (Banno *et al.*, 2009b). Darüber hinaus leiden die Betroffenen trotz normaler oder sogar erhöhter Androgenlevel häufig an Infertilität, verminderter Libido, Gynäkomastie, testikulärer Atrophie und erektiler Dysfunktion (Bingham, 1995, Guidetti, 1996), was auf eine leichte Androgeninsensitivität zurückgeführt wird (Arbizu *et al.*, 1983, Dejager *et al.*, 2002).

1.3.2 Ursachen von SBMA

Trotz der vielen Indizien für eine Funktionszunahme des AR wurde erst angenommen, dass SBMA auf einen teilweisen Funktionsverlust zurückgehen könnte, der auf einer Abnahme der maximalen Ligandenbindung (Danek *et al.*, 1994) oder auf einer reduzierten Proteinexpression (Choong *et al.*, 1996, Brooks *et al.*, 1997) beruhen könnte. Neueste Studien gehen jedoch davon aus, dass der AR eine gesteigerte toxische Funktion („*gain of toxic function*“) annimmt (Lyon und Hawkes, 1970, Neuschmidt-Kaspar *et al.*, 1996, McManamny *et al.*, 2002).

Um zu verstehen, wie eine Erweiterung des polyQ-Traktes im Androgenrezeptor zu den o. g. Defekten und der Krankheit SBMA führen kann, ist die Kenntnis über das AR-Protein selbst und dessen Wirkungsweise vonnöten.

1.4 Der Androgenrezeptor in Zusammenhang mit SBMA

1.4.1 Aufbau des Androgenrezeptor-Proteins

Der Androgenrezeptor gehört zur Superfamilie der nukleären Steroidhormonrezeptoren, die Signale von fettlöslichen Hormonen vermitteln (Evans, 1988, Gelmann, 2002). Wie auch andere Steroidhormonrezeptoren, besteht der AR im Allgemeinen aus drei wichtigen funktionalen Domänen: 1) der N-terminalen Domäne (NTD), die die *activation function-1* (AF-1) enthält, 2) der DNA-Bindedomäne (DBD) und 3) der C-terminalen Liganden-Bindedomäne (LBD), welche die sog. AF-2 beinhaltet, die die Transkription Hormon-abhängig reguliert (Janne und Shan, 1991, aus Review Kumar *et al.*, 2011). Zwischen DBD und LBD befindet sich die *hinge*-Region – eine relativ flexible Aminosäuresequenz (Janne und Shan, 1991, aus Review Kumar *et al.*, 2011) (Abb. 1).

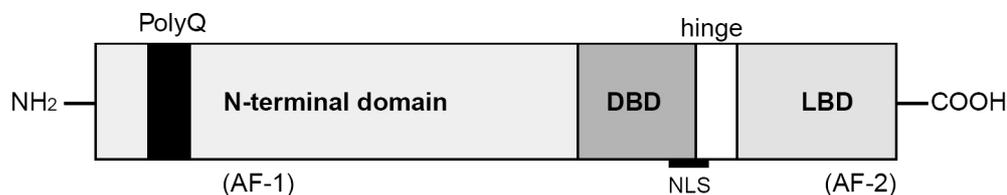


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Androgenrezeptor-Proteins (aus Review Katsuno *et al.*, 2003)

1.4.2 Aktivität des Androgenrezeptors

Der neu synthetisierte AR ist im Zytoplasma in einen sog. Aporezeptorkomplex integriert, in welchem er an Hitzeschockproteine (Hsp) wie Hsp90, 70, 56, 40, sowie an p23 und Immunophilinen gebunden ist (Veldscholte *et al.*, 1992, Pratt und Welsch, 1994, Bohen *et al.*, 1995, Caplan *et al.*, 1995). Dadurch wird eine Konformation erzeugt, welche das Binden von Hormonen gestattet (Pratt und Toft, 1997, Pratt *et al.*, 2004), den AR gleichzeitig jedoch in einer transkriptionell inaktiven Form hält (Marivoet *et al.*, 1992). Durch das Binden des Liganden Testosteron oder dessen

Metabolit 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) wird der AR vom Aporezeptorkomplex gelöst und aktiviert (Wilson, 1996). Das ist auch ein Grund dafür, dass nur Männer von SBMA betroffen sind (Kennedy *et al.*, 1968, La Spada *et al.*, 1991), denn die Krankheit ist stark von der Testosteronkonzentration im Körper abhängig (Katsuno *et al.*, 2003). Dies wurde bestätigt durch einige wenige Berichte über Frauen, welche den pathologischen Androgenrezeptor heterozygot exprimierten. So wurde beispielsweise über eine 85-jährige Frau berichtet, welche ARQ37 und ARQ51 exprimierte und keinerlei klinische SBMA-Symptome zeigte (Kuhlenbäumer *et al.*, 2001) bzw. über einige polyQ-AR-heterozygote Frauen, welche subklinische Symptome offenbarten, deren AR-polyQ-Länge jedoch nicht näher bestimmt wurde (Sobue *et al.*, 1993).

Durch die Ligandenbindung erfährt der AR Konformationsänderungen. Eine solche ist die wichtige Interaktion des N-terminalen FxxLF-Motivs, welches sich über Aminosäure 23-27 erstreckt (genau: ²³FQNLF²⁷) (Ikonen *et al.*, 1997, He *et al.*, 1999, 2000, aus Review Kumar *et al.*, 2011), mit der C-terminal gelegenen AF-2 Domäne, wodurch der AR-Androgen-Komplex stabilisiert und anschließende transkriptionelle Steuerung ermöglicht wird (Ikonen *et al.*, 1997, Lin *et al.*, 2001). Darüber hinaus erfährt der AR verschiedene post-translationale Modifikationen, welche einen wichtigen Beitrag zur Funktion und dem Lebenszyklus des AR-Proteins beitragen: Phosphorylierung, Acetylierung, SUMOylierung, Methylierung und Ubiquitinierung (vgl. Review Gioeli und Paschal, 2011).

Nach der Ligandenbindung wird der Androgenrezeptor aktiv in den Zellkern transportiert, wo er als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor wirkt (Jenster *et al.*, 1993, Zhou *et al.*, 1994, Palazzolo *et al.*, 2008).

1.4.3 Transaktivierung des Androgenrezeptors

Zur transkriptionellen Aktivierung des AR werden Koaktivatoren rekrutiert (Jenster, 1998, Heinlein und Chang, 2002), welche direkt agieren oder indirekt durch das Hinzuziehen von Enzymen, um Chromatin zu modifizieren (Urnov und Wolffe, 2001, Heinlein und Chang, 2002, Narlikar *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu kann die

Transaktivierung des AR durch Korepressoren über verschiedene Mechanismen verhindert werden (Dotzlaw *et al.*, 2002, Liao *et al.*, 2003), z. B. durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDAC) (White *et al.*, 2004), welche die transkriptionelle Aktivität des AR herunterregulieren und die Genexpression hemmen können (Wang *et al.*, 2005, Gurevich *et al.*, 2007).

1.4.4 Auswirkungen der polyQ-Amplifikation auf den Androgenrezeptor

Die genaue Funktion des polyQ-Traktes im nativen AR ist unbekannt, es wird aber angenommen, dass die polyQ-Sequenz eine repressive Wirkung auf die Aktivität des AR ausübt (Mhatre *et al.*, 1993, Kazemi-Esfarjani *et al.*, 1995). Umfasst der polyQ-Trakt des AR mehr als 40 Glutaminreste und ist somit pathologisch erweitert, führt dies dazu, dass die Fähigkeit des AR zur Transaktivierung zwar vermindert ist (Chamberlain *et al.*, 1994, Tut *et al.*, 1997, Beilin *et al.*, 2000), jedoch Hormon-responsive Gene nach wie vor aktiviert werden können (Jenster *et al.*, 1991). Es wurde auch gezeigt, dass der pathologisch amplifizierte polyQ-Trakt das ganze Protein destabilisieren konnte (Bevivino und Loll, 2001), dennoch gibt es bislang keine eindeutige Beziehung zwischen der Polyglutamin-Länge und den daraus resultierenden Folgen für die Stabilität des gesamten Proteins (Review Saunders und Bottomley, 2009). Vielmehr führt der pathologisch erweiterte polyQ-Trakt dazu, dass das Protein anti-parallele β -Faltblätter ausbildet, welche durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden (Perutz *et al.*, 1994, aus Review Parodi und Pennuto, 2011), aggregieren und schließlich zu Bildung von toxischen Oligomeren und intrazellulären Einschlüssen führen (Review Parodi und Pennuto, 2011).

1.5 Aggregation toxischer polyQ-Proteine

Die Fähigkeit, toxische intrazelluläre Aggregate zu bilden, ist die gemeinsame Eigenschaft aller polyQ-Proteine (Davies *et al.*, 1997, DiFiglia *et al.*, 1997). Solche Aggregate wurden zuerst in den Neuronen transgener Maus-Modelle von Huntington entdeckt (Davies *et al.*, 1997, DiFiglia *et al.*, 1997) und anschließend in den Gehirnen von Patienten mit allen bisher identifizierten polyQ-Erkrankungen nachgewiesen (Ross, 1997, Davies *et al.*, 1999, Review Bauer und Nukina, 2009).

1.5.1 Androgenrezeptor-Aggregate bei SBMA

Allgemein gilt eine Wiederholung von mehr als 40 Glutaminen als Schwellwert zur Bildung toxischer Protein-Konformationen (Gusella und MacDonald, 2000, aus Review Hirth, 2010), was auch für den pathologischen Androgenrezeptor zutrifft (Fischbeck *et al.*, 2001, Adachi *et al.*, 2007a, aus Review Kumar *et al.*, 2011). Die AR-Aggregate treten insbes. in den betroffenen Motorneuronen des Stammhirns und des Rückenmarks in Augenschein (Yamada *et al.*, 2008, Banno *et al.*, 2009b, aus Review Ranganathan und Fischbeck, 2010) und werden sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma in Geweben von SBMA-Patienten gefunden (Adachi *et al.*, 2005). SBMA scheint aber nur dann ausgelöst zu werden, wenn sich der mutierte AR im Nukleus befindet (Takeyama *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2002).

Verschiedene Mechanismen wurden bislang beschrieben, welche die Ausbildung der sichtbaren Proteinaggregate bei SBMA zur Folge haben könnten, darunter vor allem die Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen, welche dazu führen, dass das AR-Protein eine nicht-native Konformation annimmt, sich anreichert und schließlich Oligomere und Aggregate bildet (Perutz *et al.*, 1994, Perutz, 1999). Ein weiterer Mechanismus, der zur Ausbildung von Proteinaggregaten führen kann, ist das Verklumpen kleinerer Proteinfragmente, welche durch Degradierung des AR über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (Paulson *et al.*, 2000, Walcott und Merry, 2002) oder aufgrund Kaspasen-vermittelter Apoptose (Butler *et al.*, 1998, Merry *et al.*, 1998) entstehen

können. Es wurde gezeigt, dass die Proteinaggregate aus N-terminalen AR-Fragmenten bestehen, da mithilfe spezifischer Antikörper nur N-, nicht aber C-terminale AR-Fragmente in AR-Inklusionen nachgewiesen werden konnten (Banno *et al.*, 2009b).

Mittlerweile wird angenommen, dass die sichtbaren Proteinaggregate eher eine protektive und nicht eine toxische Wirkung auf die Zelle innehaben, sondern vielmehr Zwischenprodukte auf dem Weg vom nativen polyQ-Protein zum toxischen Aggregat (De Luchi *et al.*, 2003, Takahashi *et al.*, 2008) die Krankheits-auslösende Rolle spielen. Dennoch wurde aber auch gezeigt, dass eine Korrelation zwischen Aggregatbildung und Toxizität besteht, sodass bislang nicht eindeutig geklärt ist, ob die Aggregate tatsächlich die Toxizität des Androgenrezeptors vermitteln oder ob sie eher den Endzustand des mutierten Proteins darstellen, nachdem der mutierte Androgenrezeptor seine toxische Wirkung ausgeübt hat (Adachi *et al.*, 2007a, Li *et al.*, 2007, aus Review Ranganathan und Fischbeck, 2010).

Zur weiteren Untersuchung des pathologischen Androgenrezeptors und den Umständen, die zu SBMA führen, sind *in vitro*- und *in vivo*-Modellorganismen unverzichtbar.

1.6 Modellorganismen von SBMA

1.6.1 Zell-Modelle

Die ersten Anläufe zur Untersuchung von spinaler und bulbärer Muskelatrophie wurden an kultivierten Zellen vorgenommen, die sowohl nicht-neuronalen (Merry *et al.*, 1998, Becker *et al.*, 2000, Caplen *et al.*, 2002, Furutani *et al.*, 2005) als auch neuronalen (Brooks *et al.*, 1997, Nakajima *et al.*, 1997, Darrington *et al.*, 2002) Ursprungs waren. Dabei wurde u. a. beobachtet, dass es polyQ-abhängige Unterschiede bezüglich der subzellulären Lokalisation des AR in An- und Abwesenheit von Androgenen gab, sodass der polyQ-erweiterte AR langsamer in den Zellkern

translokalisierte (Becker *et al.*, 2000, Palazzolo *et al.*, 2010). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass AR-Konstrukte mit verschiedenen polyQ-Längen durch Kaspase-3 unterschiedlich fragmentiert wurden (Kobayashi *et al.*, 1998) und dass in Abhängigkeit der Länge der Polyglutamin-Sequenz unterschiedliche Auswirkungen auf das Aggregations-Verhalten, proteolytische Prozessierung sowie Toxizität der kultivierten Zellen (Merry *et al.*, 1998) zu verzeichnen waren.

1.6.2 Maus-Modelle

Um die anhand der Zell-Modelle gewonnen Erkenntnisse *in vivo* zu verifizieren und zu ergänzen, wurde 1995 durch Bingham und Kollegen das erste SBMA Maus-Modell vorgestellt (Bingham *et al.*, 1995). Dieses exprimierte zusätzlich zum endogenen Androgenrezeptor ARQ45 mithilfe des Interferon-induzierbaren Mx-Promotors. Allerdings lag die Expression des transgenen AR-Konstrukts sogar noch unter dem Expressionsniveau des endogenen Wildtyp-Androgenrezeptors und die AR-transgenen Mäuse offenbarten überhaupt keinen SBMA-Phänotyp (Bingham *et al.*, 1995). Ein Jahr später wurde ein weiteres transgenes SBMA Maus-Modell publiziert, welches ARQ66 mithilfe des NSE (*neuron-specific enolase*)- oder NFL (*neurofilament light chain*)-Promotors exprimierte. Obwohl anschließend die Expression des pathologischen AR 2-5 mal höher war als die des endogenen AR, zeigten die Mäuse dennoch keinerlei neurologische Symptome; es wurde angenommen, dass der polyQ-Trakt noch immer zu kurz war (Merry *et al.*, 1996, aus Review Katsuno *et al.*, 2003). 1998 wurde ARQ45 in transgenen Mäusen mithilfe künstlicher Hefe-Chromosomen (*yeast artificial chromosomes*, YACs) so eingebracht, dass das AR-Gen von nicht-kodierenden Sequenzen umgeben war. Diese Mäuse zeigten einen Phänotyp, der nicht Geschlechtsspezifisch und stärker war, wenn ARQ45 über die Mutter vererbt wurde und umso stärker ausgeprägt war, je älter die Mutter war. Die Expression des mutierten AR konnte allerdings weder in *Real Time*-PCR, noch in Western Blot Analysen nachgewiesen werden (La Spada *et al.*, 1998, aus Review Katsuno *et al.*, 2003). Eine andere Annäherung unternahm die Arbeitsgruppe um Adachi. Diese generierte ein transgenes Maus-Modell, welches ein AR-Konstrukt mit 239 polyQ mithilfe des humanen AR-Promotors exprimierte. Die Mäuse legten anschließend eine kleinere

Körpergröße, Muskelschwäche, Koordinationsstörungen und eine kürzere Lebenserwartung an den Tag. Darüber hinaus wurden in diesem Maus-Modell nukleäre Inklusionen gefunden, welche sich in verschiedenen Geweben des zentralen Nervensystems anlagerten und somit deutlich weiter verbreitet waren als die Inklusionen, die bei SBMA-Patienten gefunden wurden (Adachi *et al.*, 2001, aus Review Katsuno *et al.*, 2003). Im selben Jahr wurde ein weiteres SBMA-Maus-Modell vorgestellt, welches den N-terminalen Teil des AR mit 112 polyQ mithilfe des NFL- oder Prion-Protein-Promotors exprimiert. Während die Effekte mit letztgenanntem Promotor nicht SBMA-spezifisch waren, rief die Expression über den NFL-Promotor motorische Störungen hervor, wie sie auch bei SBMA gefunden wurden, jedoch waren nicht nur niedere, sondern auch höhere Motorneuronen betroffen (Abel *et al.*, 2001, aus Review Katsuno *et al.*, 2003).

Erst 2002 konnte das erste „richtige“ SBMA-Mausmodell von zwei Arbeitsgruppen publiziert werden (McManamny *et al.*, 2002, Katsuno *et al.*, 2002). Diese transgenen Mäuse exprimierten den humanen AR in voller Länge (*full length*) im ganzen Körper mithilfe des CMV-Promotors (*Cytomegalie-Virus*) mit N-terminalen pathologisch erweiterten polyQ-Trakten von 97 (Katsuno *et al.*, 2002) bzw. 120 polyQ (McManamny *et al.*, 2002) und wiesen u. a. verminderte Motorik, nukleäre Proteineinschlüsse in den Motorneuronen, degenerierte Motorneuronen, ein geringeres Körpergewicht, eine verminderte Lebenserwartung und progressive Muskelschwäche auf, während Mäuse, die den nativen Androgenrezeptor exprimierten, keinerlei SBMA-Symptome aufwiesen. Die Defekte waren zudem Geschlechts-spezifisch (Katsuno *et al.*, 2002); nur männliche Mäuse zeigen die genannten Symptome, wohingegen weibliche transgene Mäuse komplett oder nahezu symptomfrei waren (Katsuno *et al.*, 2003).

Inzwischen wurden viele weitere Maus-Modelle etabliert, welche entweder nur den N-terminalen Teil oder andere Teile des AR mit der Polyglutamin-Sequenz oder den gesamten Androgenrezeptor exprimieren (Review Monks *et al.*, 2008).

Anhand eines SBMA Maus-Modells wurde erst entdeckt, dass die Krankheit einzig und alleine durch den pathologisch polyQ-erweiterten Androgenrezeptor verursacht wird und dass die Aktivierung des Androgenrezeptors und seine Toxizität von seinem

Liganden abhängig sind (Chevalier-Larsen *et al.*, 2004, Katsuno *et al.*, 2004): Wurde die starke Wirkung des Androgenrezeptors verhindert, indem männliche Mäuse kastriert wurden, war die Motorik der Tiere im Vergleich zu unoperierten Mäusen stark verbessert und die Überlebensrate erhöht (Katsuno *et al.*, 2002, Review Katsuno *et al.*, 2003, Chevalier-Larsen *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte in weiblichen Versuchstieren ein SBMA-Phänotyp erst dann hervorgerufen werden, wenn diesen Tieren Testosteron verabreicht wurde (Katsuno *et al.*, 2003).

1.6.3 *Drosophila*-Modelle

Neben den Maus-Modellen kommt zur Erforschung neurodegenerativer polyQ-Krankheiten und SBMA auch schon lange die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* erfolgreich zum Einsatz (s. Review Hirth, 2010). Dabei wird vor allem von der einfachen Manipulierbarkeit dieses Modells profitiert. Mithilfe des GAL4-UAS-Systems (Brand und Perrimon, 1993) kann nahezu jedes beliebige Gen in beliebigen Zellen und Geweben exprimiert werden. Dazu werden zwei individuelle Fliegenlinien – eine sog. Treiber- und Effektorlinie – miteinander verkreuzt. In der ersten Tochtergeneration wird das Ziel-Gen dann nur in den durch die Treiberlinie definierten Zellen exprimiert (Brand und Perrimon, 1993, Duffy, 2002).

So wurden 2002 die ersten SBMA Fliegen-Modelle publiziert (Caplen *et al.*, 2002, Takeyama *et al.*, 2002, Chan *et al.*, 2002), welche Wildtyp- und polyQ-erweiterte AR-Konstrukte im Auge bzw. in kultivierten Zellen (Caplen *et al.*, 2002) exprimierten, was zu Neurodegeneration bzw. zu Aggregat-Bildung führte. In den darauffolgenden Jahren wurden weitere *Drosophila*-Modelle von SBMA entwickelt. Alle exprimierten verschiedene AR-Konstrukte im Auge (Furutani *et al.*, 2005, Murata *et al.*, 2008, Suzuki *et al.*, 2009, Nedelsky *et al.*, 2010), was wiederum zu Neurodegeneration führte, i. e. einen raue Augen-Phänotyp hervorrief, mit Ausnahme von Nedelsky und Kollegen sowie der Arbeitsgruppe um Funderburk, welche zusätzliche *Drosophila*-Treiberlinien heranzogen und AR-Konstrukte panneuronale, in Motorneuronen und in Speicheldrüsen-Gewebe einbrachten. Die transgenen Fliegen wurden eingesetzt zur Untersuchung verschiedener Substanzen mit möglicher therapeutischer Wirkung wie

AR-Antagonisten (Furutani *et al.*, 2005), HDAC-Inhibitoren (Funderburk *et al.*, 2008) oder B2 (Palazzolo *et al.*, 2010), Gen-Überexpressionen (Murata *et al.*, 2008) und AR-Transaktivierung (Review Nedelsky *et al.*, 2008).

Die Maus- und *Drosophila*-Modelle erwiesen sich damit nicht nur als geeignet, um einen SBMA-Phänotyp hervorzurufen und mehr über die Krankheit in Erfahrung zu bringen, sondern waren gleichzeitig gute Modelle, um mögliche SBMA-Inhibitoren *in vivo* zu testen.

1.7 Mögliche SBMA-Inhibitoren

Seit bekannt ist, dass SBMA durch den mutierten, fehlgefalteten Androgenrezeptor, welcher in seiner Wirkung Liganden-abhängig ist, verursacht wird, wurde eine Vielzahl unterschiedlichster Bestrebungen unternommen, in diesen Prozess einzugreifen und die Symptome, die mit dieser Mutation einhergehen, abzuschwächen. Eine Annäherung war dabei die Überexpression von Hitzeschockproteinen, welche missgefaltete Proteine erkennen, diese in ihrer monomerischen Konformation stabilisieren und zudem deren Aggregationsverhalten unterdrücken (Muchowski *et al.*, 2000, aus Review Bauer und Nukina, 2009). Diese Effekte wurden insbes. für die Überexpression der Hitzeschockproteine Hsp40 und 70 in Zellkultur-Analysen gezeigt (Kobayashi *et al.*, 2000, aus Review Bauer und Nukina, 2009).

Ein weiterer Ansatzpunkt zum Therapieren von SBMA war allgemein das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), welches für den Abbau fehlgefalteter Proteine zuständig ist. Die chemische Inhibierung von Hsp90 beispielsweise führte dazu, dass der AR, ein „Kunde“ (*client*) des Hsp90, vermehrt über das UPS degradiert und abgebaut wurde (Tokui *et al.*, 2009). Die Überexpression von CHIP (Hsc70-Interaktionsprotein) führte in einem SBMA Maus-Modell zur Verbesserung der Symptome und verhinderte die Akkumulation des mutierten AR in Neuronen. Darüber hinaus wurde der mutierte AR ebenfalls verstärkt degradiert und abgebaut (Adachi *et al.*, 2007b).

Des Weiteren konnten Ranganathan und Kollegen nachweisen, dass die Expression des mutierten Androgenrezeptors in kultivierten Zellen zu einer Depolarisation der mitochondrialen Membran führte, was eine Erhöhung an oxidativem Stress, i. e. des Niveaus an Reaktiven Sauerstoff-Spezies, mit sich brachte. Zudem konnte im Zell-Modell eine Assoziation des AR mit Mitochondrien nachgewiesen werden. In einem SBMA Maus-Modell wurde in degenerierenden Geweben ein erhöhtes Niveau des Mitochondrien-spezifischen Antioxidants Superoxiddismutase-2 beobachtet (Ranganathan *et al.*, 2009). Ein Entgegenwirken Reaktiver Sauerstoff-Spezies, beispielsweise durch Verabreichung des Coenzym Q10, könnte die mitochondrialen Defekte verringern und sich positiv in Bezug auf SBMA auswirken (Ranganathan *et al.*, 2009).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Überexpression einer Muskel-spezifischen IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*)-Isoform in transgenen Mäusen eine erhöhte Akt-Aktivierung und damit einhergehend eine vermehrte AR-Phosphorylierung und gleichzeitig verminderte AR-Aggregation mit sich brachte und somit ebenfalls einen therapeutischen Ansatz darstellen könnte (Palazzolo *et al.*, 2009).

Außerdem wurde insbes. die Reduktion des Testosteron-Spiegels und Histondeacetylasen als möglicher Ansatzpunkt zur Therapie von SBMA in Betracht gezogen. Neueste Forschungen an neurodegenerativen Krankheiten richten zudem zunehmend das Augenmerk auf das Hormon Melatonin.

1.7.1 Reduktion des Testosteron-Spiegels

Da das Binden des Liganden Testosteron bzw. DHT zur Translokalisierung des Androgenrezeptors in den Zellkern führt (Stenoien *et al.*, 1999, Katsuno *et al.*, 2002), und der AR nur im Zellkern seine pathogene Wirkung entfalten zu können und zu SBMA zu führen scheint (Review Brooks und Fischbeck, 1995, Katsuno *et al.*, 2002), wurde versucht, in diese Ligand-Rezeptor-Interaktion einzugreifen. Dies erfolgte zum einen durch operative Kastration in einem SBMA Maus-Modell und führte durch Reduktion des Testosteron-Spiegels zu starken Verbesserungen des Phänotyps

(Katsuno *et al.*, 2002). Zum anderen wurden chemische Substanzen wie Leuprorelin, ein GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*)-Analogon, an einem transgenen SBMA Maus-Modell getestet mit dem Ergebnis, dass der neuromuskuläre Phänotyp verbessert und die Lebenserwartung der Tiere erhöht waren (Katsuno *et al.*, 2003a).

In jüngster Zeit erreichte Leuprorelin Phase 2 in einer klinischen Studie und schien dabei in einer 48-wöchigen, Placebo-kontrollierten Untersuchung ein vielversprechendes Medikament im Hinblick auf die Verbesserung der negativen Effekte bei SBMA-Patienten zu sein (Banno *et al.*, 2009a, aus Review Bauer und Nukina, 2009). Sowohl die Aggregation von AR-Protein im Zellkern als auch das Schluckvermögen betreffend zeigten sich positive Effekte bei den Patienten. Ein Jahr später wurde in Japan eine weitere Studie abgeschlossen, bei welcher sich allerdings weniger Verbesserungen abzeichneten (Katsuno *et al.*, 2010, aus Review Ranganathan und Fischbeck, 2010).

Eine andere zweijährige, doppel-blind Placebo-kontrollierte klinische Studie mit Dutasterid, einem 5 α -Reduktase-Hemmer, der die Umwandlung des Hormons Testosteron in DHT verhindert, wurde durchgeführt mit der Idee, dass Dutasterid möglicherweise nur die Toxizität des Androgenrezeptor in den betroffenen Motorneuronen verhindern könnte, in anderen Geweben wie etwa im Muskel aber keinen negativen Einfluss auf den AR hätte. 50 SBMA-Patienten wurden entweder mit Dutasterid oder einem Placebo behandelt. Hinsichtlich der untersuchten Parameter, insbes. Muskelstärke (*quantitative muscle assessment*, QMA), gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungen (Fernández-Rhodes *et al.*, 2011). Somit zeigten sich bislang weder Leuprorelin noch Dutasterid als wirkungsvolle Substanzen zur Therapie von SBMA (Review Ranganathan und Fischbeck, 2010), sodass nach wie vor nach geeigneten Substanzen gesucht werden muss.

1.7.2 Histondeacetylasen-Inhibitoren

Im Hinblick auf die Verminderung der polyQ-Protein-induzierten Effekte standen auch insbes. die Methylierung und Acetylierung von Histonen im Fokus (Review Bauer und Nukina, 2009): In den meisten neurodegenerativen Erkrankungen, auch bei SBMA, wurde eine transkriptionelle Dysfunktion mit einer verringerten Aktivität von Histon-Acetyltransferasen (HAT) - Enzyme, welche Acetylgruppen auf die Aminosäure Lysin von Histone übertragen und die Transkription von Genen einleiten - in Verbindung gebracht (Colussi *et al.*, 2010). Die transkriptionelle Dysfunktion bei SBMA könnte zum Teil durch eine Abnahme von HAT vermittelt werden (Boutillier *et al.*, 2007, Hahnen *et al.*, 2008, aus Review Ranganathan und Fischbeck, 2010). Der AR ist ein direktes Substrat für HAT (Review Gioeli und Paschal, 2011) und in Zell- und Maus-Modellen wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der HAT-Aktivität durch Inhibition des HAT-Gegenspielers - Histondeacetylasen (HDAC) - eine effektive Strategie sein könnte, um den Fortschritt neuronaler Degeneration zu verlangsamen oder gar einzustellen (Colussi *et al.*, 2010).

Einige der derzeit meist verwendeten HDAC-Inhibitoren (HDACi) sind Trichostatin A, SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*), Valproinsäure und Natriumbutyrat (McCampbell *et al.*, 2000, Minamiyama *et al.*, 2004, Colussi *et al.*, 2010, Dietz und Casaccia, 2010). Diese kommen zwar als mögliche Substanzen zur Abmilderung der SBMA-Symptome in Frage, allerdings sind diese Chemikalien auch sehr giftig für den Organismus und darüber hinaus sehr unspezifisch (Review Ranganathan und Fischbeck, 2010), sodass weiter nach einer Substanz zu suchen gilt, die die negativen Folgen des mutierten Androgenrezeptors abmildert, gleichzeitig aber für den Organismus nicht toxisch ist.

1.7.3 Melatonin

Seit vielen Jahren wird Melatonin, dessen Hauptfunktion die circadiane Regulation ist (Redman *et al.*, 1983, Armstrong *et al.*, 1986), für eine Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt. In letzter Zeit erlangte Melatonin immer größere Bedeutung auf dem Gebiet neurodegenerativer Erkrankungen, da zunehmend die antioxidativen (Reiter *et al.*, 1995, Miller *et al.*, 1996, Reiter 1998, Wu und Swaab, 2005), antiapoptotischen (Sainz *et al.*, 2003, Pandi-Perumal *et al.*, 2006, Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2009a) und neuroprotektiven Wirkungen von Melatonin entdeckt und erforscht werden (Srinivasan *et al.*, 2005, Review Wang, 2009).

1.7.3.1 Melatonin in Zusammenhang mit SBMA

Spinale und bulbäre Muskelatrophie betreffend, wurde bislang nur eine einzige Studie veröffentlicht, bei welcher ein transgenes *Drosophila*-Modell verschiedene AR-Konstrukte im Auge oder panneuronal exprimierte. Dabei konnte Melatonin den DHT-induzierten Phänotyp bezüglich der Neurodegeneration von Ommatidien sowie lokomotorische Fähigkeiten und die Überlebensrate der untersuchten Fliegenlarven signifikant verbessern und hatte keine toxischen Wirkungen auf die Larven (Funderburk *et al.*, 2008). Somit scheint Melatonin eine vielversprechende Substanz zur Abmilderung der Symptome, welche SBMA und andere neurodegenerative polyQ-Erkrankungen mit sich bringen, zu sein.

1.8 Ziel der Arbeit

Die Expression des pathologischen polyQ-Traktes im Androgenrezeptor führt zu einem neurodegenerativen Phänotyp, für welchen es bislang noch keine Therapie gibt. Ziel der Arbeit war es, in einem spezifischen SBMA-*Drosophila*-Modell, anhand dessen sowohl nicht-pathologische als auch pathologische Androgenrezeptor-Konstrukte ausschließlich in Motoneuronen exprimiert werden konnten, die Auswirkungen des pathologischen Androgenrezeptors auf die Überlebensrate und Motorik AR-transgener Fliegen sowie auf die Morphologie der neuromuskulären Verbindungen AR-transgener Fliegenlarven zu untersuchen. Anhand dieses Modells wurde das Hormon Melatonin in seiner Wirkung als möglicher Inhibitor der polyQ-Pathogenizität untersucht. Zelluläre Systeme wurden anschließend herangezogen, um den Wirkungsmechanismus von Melatonin durch den Androgenrezeptor näher zu eruieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
2-Phenylmelatonin	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
5 α -androstan-17 β -Hydroxy-3-on (DHT)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
8-methoxy-2-propionamidotetralin	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar (fädig)	Probio GmbH, Eggenstein
Agar (Pulver)	Difco Laboratories, Augsburg
Agarose	PeqLab, Erlangen
Aktivkohle	Roth, Karlsruhe
Apfelsaft	Verschiedene Quellen
Amersham Hyperfilm® ECL	GE Healthcare, Freiburg
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto Trypton	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Bierhefe	Probio GmbH, Eggenstein
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
D-Liziferin (Glühwürmchen)	Biosynth AG, Staad
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
DNA Marker 1kb	PeqLab, Erlangen
Desoxyribonukleosidtriphosphate	PeqLab, Erlangen
Dithiothreitol	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat	Roth, Karlsruhe
Ethanol techn.	Roth, Karlsruhe
FuGene®	Promega, Mannheim
Fötales Kalbserum	Thermo-Fischer, Schwerte
GeneJuice®	Merck Biosciences, Darmstadt

Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycylglycerin	Roth, Karlsruhe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Hefe (Frischhefe)	Verschiedene Quellen
Hefeextrakt	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hydrogenchlorid (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Maismehl	Friedrichstal Mühle, Stutensee
Melatonin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methyl-4-Hydroxybenzoat (Nipagin)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Mowiol® 40-88 (Polyvinylalkohol)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriummetavanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphat-gepufferte Salzlösung	Roth, Karlsruhe
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
Protein Assay 5X Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteininhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinmarker	Roth, Karlsruhe
Rotisol	Roth, Karlsruhe
Sf-900™ III SFM	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin	Roth, Karlsruhe
Trehalose	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe

Tween-20	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum (normal goat serum)	Dako Glostrup, Dänemark
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zuckerrübensirup	Grafschafter Krautfabrik, Meckenheim

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien für Labor- und Zellkulturexperimente wurden von folgenden Firmen bezogen: Greiner, Frickenhausen; Thermo Scientific, Langenselbold; Millipore, Schwalbach; Amersham, Braunschweig; FujiFilm, Düsseldorf.

2.1.3 Plasmide zur Expression in *Drosophila* zur Generierung sog. Effektorlinien

Bezeichnung	Beschreibung
pUAST ^a	P-Element-Vektor mit einem <i>white eye</i> -Gen, welches eine erfolgreiche Integration in das <i>Drosophila</i> -Genom anzeigt.
pUAST-ARQ1 ^{a, c}	<i>Drosophila</i> -P-Element-Plasmid, welches cDNA des menschlichen Androgenrezeptors mit einem einzigen Glutaminrest enthält.
pUAST-ARQ22 ^{a, c}	<i>Drosophila</i> -P-Element-Plasmid, welches cDNA des menschlichen Wildtyp-AR enthält. Der Rezeptor beinhaltet eine Abfolge von 22 Glutaminresten.
pUAST-ARQ65 ^{b, c}	<i>Drosophila</i> -P-Element-Plasmid, welches cDNA des menschlichen AR mit einer Ausdehnung von 65 Glutaminresten enthält. ARQ65 wurde durch Verdau mit BglII aus pSG5ARQ65 entnommen und in pUAST eingefügt, welches zuvor mithilfe von BglII linearisiert wurde.
pUAST-ARQ22dm ^{a, d}	<i>Drosophila</i> -P-Element-Plasmid, welches cDNA des menschlichen Wildtyp-Androgenrezeptors enthält. Die Serinreste an Stelle 424 und 514 wurden jeweils durch Alanin ausgetauscht, sodass eine „Doppelmutante“ entstand.

^a Plasmide waren bereits im Labor vorhanden (Dr. Sarah Funderburk)

^b Plasmide wurden durch entsprechendes Klonieren gewonnen

^c *Drosophila*-Linien wurden von BestGene Inc., Chino Hills, CA, USA generiert

^d *Drosophila*-Linie war bereits vorhanden (Dr. Sarah Funderburk)

2.1.4 Weitere *Drosophila*-Linien

Bezeichnung	Beschreibung (Quelle)
OK371-GAL4	GAL4-Treiberlinie; Gewebe-spezifische Expression ausschließlich in Motorneuronen (eine großzügige Gabe von Prof. Dr. Christoph Schuster, Heidelberg)
Oregon-R-S	Wildtyp- <i>Drosophila</i> -Linie; Stock Nummer 4269. (Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, Universität Indiana, USA; eine großzügige Gabe von Prof. Dr. Michael Pankratz, LIMES, Bonn)

2.1.5 Verwendete Zelllinien

Name	Herkunft	Zellkultur-Medium
Sf9	Immortalisierte Zelllinie aus Ovarzellen der Mottenart <i>Spodoptera frugiperda</i>	Sf-900™ III SFM
COS-7	Immortalisierte Zelllinie aus Nierenzellen der Grünen Meerkatze	DMEM + 10 % (v/v) FCS

2.1.6 Plasmide zur Expression in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Zellen

Plasmid	Beschreibung
pDW464AR	Baculovirus-Transfer-Vektor zur rekombinanten Proteinexpression des (N-terminal biotinylierten) menschlichen Androgenrezeptors mit 22 N-terminalen Glutaminresten in Sf9 Zellen. (Eine großzügige Gabe von Ching-Yi Chang, Durham, NC, USA) (Juzumiene <i>et al.</i> , 2005).
pDW464ARQ65	Baculovirus-Transfer-Vektor zur rekombinanten Proteinexpression des (N-terminal biotinylierten) menschlichen Androgenrezeptors mit 65 N-terminalen Glutaminresten in Sf9 Zellen.
pDW646ARQ22dm	Baculovirus-Transfer-Vektor zur rekombinanten Proteinexpression des (N-terminal biotinylierten) menschlichen Androgenrezeptors mit 22 N-terminalen Glutaminresten, in welchen durch Mutagenese der beiden Serinreste an Position 424 und 514 durch Alanin ausgetauscht worden waren („Doppelmutante“), in Sf9 Zellen.

Die Plasmide waren bereits im Labor vorhanden.

2.1.7 Plasmide zur Expression in COS-7 Zellen

Plasmid	Beschreibung
pSG5ARQ22 ^a	Expressionsplasmid, welches cDNA des menschlichen Androgenrezeptors mit einem N-terminalen Polyglutamin-Trakt von 22Q beinhaltet.
pSG5ARQ65 ^b	Expressionsplasmid, welches cDNA des menschlichen Androgenrezeptors mit einem N-terminalen Polyglutamin-Trakt von 65Q beinhaltet. ARQ65 wurde mithilfe der Restriktionsenzym-Schnittstellen NarI und KpnI aus pDW464ARQ65 entnommen und in pSG5ARQ22 kloniert.
pSG5ARQ22dm ^a	Expressionsplasmid, welches die cDNA des menschlichen Androgenrezeptors mit einem N-terminalen Polyglutamin-Trakt von 22Q beinhaltet. Die Serinreste an Position 424 und 514 wurden durch Alanin ersetzt, sodass eine „Doppelmutante“ (dm) entstand.

pSG5ARQ22(F23A) ^b	Expressionsplasmid, welches cDNA des menschlichen Androgenrezeptors mit einem N-terminalen Polyglutamin-Trakt von 22Q beinhaltet. Die Aminosäure ²³ Phenylalanin wurde durch Mutagenese durch Alanin ersetzt (F23A) (s. 2.2.1.3 und 2.2.1.4).
pSG5ARQ65(F23A) ^b	Expressionsplasmid, welches cDNA des menschlichen Androgenrezeptors mit einem N-terminalen Polyglutamin-Trakt von 65Q beinhaltet. ARQ65 wurde mithilfe der Restriktionsenzym-Schnittstellen NarI und KpnI aus pSG5ARQ65 entnommen und in pSG5ARQ22(F23A) kloniert.
pSG5ARQ22dm(F23A) ^b	Expressionsplasmid, welches cDNA des menschlichen Androgenrezeptors mit einem N-terminalen Polyglutamin-Trakt von 22Q beinhaltet. Die Serinreste an Position 424 und 514 durch Alanin ersetzt wurden, sodass eine „Doppelmutante“ (dm) entstand. ARQ22(F23A) wurde mithilfe der Restriktionsenzym-Schnittstellen NarI und KpnI aus pSG5ARQ22(F23A) entnommen und in pSG5ARQ22dm kloniert.
pVP16-ARTAD ^a	Expressionsplasmid zur Generierung eines <i>Mammalian Two Hybrid</i> Systems, welches Aminosäure 14-565 des menschlichen Androgenrezeptors und einen synthetischen Linker, welcher die ersten 13 Aminosäuren der AR-Transaktivierungsdomäne kodiert, exprimiert und in die VP16-Aktivierungsdomäne (Aminosäuren 411-456) des VP16-Vektors kloniert wurde (Ghadessy <i>et al.</i> , 1999; ein großzügiges Geschenk von Dr. Karen E. Knudsen).
pVP16-ARTAD(Q65) ^b	Expressionsplasmid zur Generierung eines <i>Mammalian Two Hybrid</i> -Systems. cDNA des menschlichen AR aus pSG5ARQ65 wurde mithilfe der Restriktionsschnittstellen NarI und HindIII entnommen und in pVP16-ARTAD eingefügt.
pVP16-ARTAD(Q22dm) ^b	Expressionsplasmid zur Generierung eines <i>Mammalian Two Hybrid</i> -Systems. cDNA des menschlichen AR aus pSG5ARQ22dm wurde mithilfe der Restriktionsschnittstellen NarI und HindIII entnommen und in pVP16-ARTAD eingefügt.
pVP16-ARTAD(F23A) ^b	Expressionsplasmid zur Generierung eines <i>Mammalian Two Hybrid</i> -Systems. Die Aminosäure ²³ Phenylalanin wurde durch Alanin ersetzt (F23A). Dies wurde mithilfe von QuikChange® (s. 2.2.1.4) aus pVP16-ARTAD generiert.

pVP16-ARTAD (Q65)(F23A) ^b	Expressionsplasmid zur Generierung eines <i>Mammalian Two Hybrid</i> -Systems. (F23A) wurde mithilfe von QuikChange® (s. 2.2.1.4) aus pVP16-ARTAD(Q65) generiert.
pVP16-ARTAD (Q22dm)(F23A) ^b	Expressionsplasmid zur Generierung eines <i>Mammalian Two Hybrid</i> -Systems. (F23A) wurde mithilfe von QuikChange® (s. 2.2.1.4) aus pVP16-ARTAD(Q22dm) generiert.
<i>Renilla</i> -tk-luc ^a	Vektor, welcher cDNA enthält, die für die <i>Renilla</i> -Luziferase kodiert. Als interne Transfektionskontrolle verwendet. (Promega, Mannheim)
hAR LBD GAL4 DBD ^a	GAL4-DNA-Bindedomäne (Aminosäure 1-147)-Vektor, in welchen die Ligandenbindedomäne (Aminosäure 624-919) des humanen AR kloniert worden war (Ghadessy <i>et al.</i> , 1999; ein großzügiges Geschenk von Dr. Karen E. Knudsen). Zur Generierung des <i>Mammalian Two Hybrid</i> -Systems.
pSGΔE4-38-luc ^a	Luziferase-Reporter-Vektor zur Generierung des <i>Mammalian Two Hybrid</i> -Systems, in welchem ein Luziferase-Reportergen stromabwärts einer UAS (<i>upstream activation sequence</i>), an welche GAL4 band, kloniert wurde.

^a Plasmide waren bereits im Labor vorhanden

^b Plasmide wurden durch entsprechendes Klonieren generiert

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Beschreibung (Bezugsquelle)
anti-AR 441	Monoklonaler (Maus) Antikörper, gegen Aminosäure 299-315 des humanen AR gerichtet (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg)
anti-AR F39.4.1	Monoklonaler (Maus) Antikörper, gegen Aminosäure 301-320 des humanen AR gerichtet (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg)
anti-AR N-20	Polyklonaler (Kaninchen) Antikörper, gegen die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren des humanen AR gerichtet (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg)
anti- α -Tubulin (H-300)	Monoklonaler (Maus) Antikörper gegen aa 149-448 des Haushaltsproteins α -Tubulin versch. Spezies gerichtet (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg)
HDAC-2 (C-19)	Polyklonaler (Ziege) Antikörper gegen den C-Terminus von menschlichem HDAC2 gerichtet (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg)
anti- β -Aktin	Monoklonaler (Maus) Antikörper gegen β -Aktin versch. Spezies gerichtet (Abcam, Cambridge, England)

2.1.8.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Quelle
Ziege anti-Kaninchen-HRP	DAKO Diagnostika GmbH, Deutschland; für Western Blot Analysen
Ziege anti-Maus-HRP	DAKO Diagnostika GmbH, Deutschland; für Western Blot Analysen
Kaninchen-anti-Ziege-HRP	DAKO Diagnostika GmbH, Deutschland; für Western Blot Analysen
Alexa Fluor® 488 Ziege-anti-Maus	Invitrogen, Karlsruhe; für immunhistochemische Färbungen

Draq5™	Biostatus Limited, Shepshed, England; zur Sichtbarmachung von Zellkernen bei immunhistochemischen Färbungen
Cy™ 5	Cy™5-gekoppelte AffiniPure Ziege-anti-Meerrettich-peroxidase-Antikörper (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, England).

2.1.9 Enzyme

FastDigest® Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas GmbH, St. Leon-Roth bezogen.

Die zur Ligation verwendete T4-DNA-Ligase und der dazugehörige 10X Puffer wurden ebenfalls von Fermentas bezogen.

2.1.10 Messgeräte

Name	Hersteller
VICTOR™ Light 1420 Luminescence Counter	PerkinElmer, Rodgau
ELx 808 iu Ultra Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, Inc., Bad Friedrichshall
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg
infinite F200	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich

2.1.11 Mikroskope

Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenz-Mikroskop, konfokal, Zeiss LSM510 META	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Fluoreszenz-Mikroskop, Leica DM5000 B	Leica Microsystems Ltd., Schweiz

2.1.12 Computerprogramme

Bezeichnung
FLUOstar OPTIMA Version 1.10-0, © 2001, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg
KC4™ Version 3.4, Bio-Tek Instruments, Inc., Bad Friedrichshall
Wallac 1420 Manager, Version 3.0, © 1997-2004, PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy, Finnland
Microsoft® Office Powerpoint® 2003, Copyright © 1987-2003 Microsoft Corporation
Microsoft® Office Excel 2003, Copyright © 1985-2003 Microsoft Corporation
Microsoft® Office Word 2003, Copyright © 1983-2003 Microsoft Corporation
Adobe® Photoshop CS2, Version 9.0, © 1990-2005 Adobe Systems Incorporated
LSM Image Browser, Version 3.5.0.359, Copyright © Carl Zeiss MicroImaging GmbH Jena 1997-2005
Laser Scanning Microscope LSM510, Release Version 4.2.SP1, Copyright © Carl Zeiss MicroImaging GmbH 1997-2007, R&D in Collaboration with EMBL, Heidelberg
i-control 1.7, © 2010 Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
CLC Sequence Viewer, Version 6.0.2, www.clcbio.com

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Klonierungen

2.2.1.1 Verdau mit Restriktionsenzymen

1 µl der verwendeten FastDigest® Enzyme (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verdaute 1 µg Lambda-DNA in 5 min bei 37°C. Je nach Versuchsanforderung – Kontrollverdau oder DNA-Verdau zur weiteren Klonierung – wurden 0,5-5 µg DNA mit dem entsprechenden Volumen an Enzymen und mit dem mitgelieferten Enzympuffer typischerweise in einem Reaktionsvolumen von 20 µl verdaut. Anschließend wurden die DNA-Fragmente elektrophoretisch ihrer Größe nach mittels eines Agarose-Gels aufgetrennt, welches typischerweise 0,8 – 1,2 %-ig konzentriert war.

2.2.1.2 Elektrophoretische DNA-Separation mittels Agarose-Gel

Je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8-1,2%-ige Agarose-Gele angefertigt. Dazu wurde die entsprechende Menge pulverförmiger Agarose eingewogen und in 1X TAE Puffer zum Kochen gebracht. Nachdem sich die gesamte Agarose gelöst hatte und die Lösung klar war, wurde sie wieder etwas abgekühlt, bevor sie mit einer kleinen Menge Ethidiumbromid versehen wurde, welches mit der DNA interkalierte und diese unter UV-Licht sichtbar machte. Die Lösung wurde in eine horizontale Gelkammer, die zuvor mit Kämmen bestimmter Taschengröße bestückt worden war, gegossen. Nachdem das Gel erhärtet war, wurde es mit 1X TAE Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit einer kleinen Menge DNA-Ladepuffer versehen und anschließend in die Geltaschen aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Tasche mit einer 1 kb Standard-DNA-Leiter (Peqlab, Erlangen) versehen, um die DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zuordnen zu können. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 – 100 V. Zur Größenanalyse der Fragmente wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
1X TAE-Puffer	0,04 M Tris-Base pH 7,2, 0,02 M Natriumacetat, 1 mM EDTA
DNA-Ladepuffer	5 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, einige Körnchen Bromphenolblau

2.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Die DNA-Gelextraktion erfolgte mithilfe des PeqGold Gelextraktions-Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

Nachdem die DNA-Fragmente elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt worden waren, wurde das gewünschte Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Gewicht des ausgeschnittenen Gel-Stücks wurde ermittelt und mit dem gleichen Volumen an Bindepuffer bei 55-65°C erhitzt, bis es vollständig geschmolzen war. Die Farbe sollte dabei leicht gelblich sein. War dies nicht der Fall, so wurde die Lösung mit 5 µl einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) versehen, um den pH-Wert ins Saure zu verschieben. Nach kurzem Vortexen wurde die Lösung auf eine mitgelieferte Säule geladen und 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Optional wurde die Säule mit 300 µl Bindepuffer gewaschen, anschließend zweimal mit 600 µl CG Wasch-Puffer, welcher zuvor 2-3 min inkubierte, gewaschen. Die Säule wurde daraufhin trocken zentrifugiert, bevor die DNA mit 30-50 µl ddest. H₂O 1 min bei 5.000 U/min eluiert wurde. Anschließend konnte die DNA-Konzentration anhand eines NanoDrop ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt werden.

2.2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten in Expressionsplasmide

Die zu klonierenden DNA-Fragmente bzw. Vektoren wurden ligiert, indem ca. 50-100 ng des Vektors mit einem 3-4-fachen Überschuss des zu inserierenden DNA-Fragments mit 1,5 µl T4 DNA-Ligase und dem entsprechenden Puffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) in einer 1X Endkonzentration in einem Endvolumen von 20 µl über Nacht bei 16°C inkubiert wurden. Das Ligationsprodukt konnte anschließend in kompetente Bakterien kloniert werden.

2.2.1.5 Einbringen einer Aminosäure-Mutation in pSG5-Expressionsplasmide

Zur Expression in COS-7 Zellen wurde die DNA von Expressionsplasmiden so mutiert, dass die Transkription zu einer Mutation der Aminosäure ²³Phenylalanin führen würde, um die Interaktion des N- und C-Terminus des AR zu unterbinden (He *et al.*, 2000):

pSG5ARQ_x(F23A): Aus dem pSG5ARQ_x-Plasmid wurde innerhalb der cDNA des menschlichen Androgenrezeptors mithilfe der beiden Restriktionsenzym-Schnittstellen EagI und SmaI ein Fragment des AR entfernt und durch eines ersetzt, welches anhand folgendermaßen kreierter Oligonukleotide durch Oligo-Hybridisierung so ersetzt wurde, sodass später Position 23 die Aminosäure **Alanin** (A) anstatt Phenylalanin (F) gebildet wurde. Die Generierung der Oligonucleotide wurde bei Metabion GmbH (Martinsried) in Auftrag gegeben und derart gestaltet, dass sie nach der Ligation auf beiden Seiten sog. klebrige Enden (*sticky ends*) aufwiesen, um in die vorbereiteten pSG5ARQ_x-Plasmide inseriert werden zu können.

Oligonukleotide:

„Vorwärts“:

5'GGCCGCCGTCCAAGACCTACCGAGGAGCT**GCC**CAGAATCTGTTCCAGAGCGTGCGCGAAGTG
ATCCAGAACCC^{3'}

„Rückwärts“:

5'GGGTTCTGGATCACTTCGCGCACGCTCTGGAACAGATTCTG**GGC**AGCTCCTCGGTAGGTCTT
GGACGGC^{3'}

2.2.1.6 Hybridisierung und Ligation zweier Oligonukleotid-Stränge

Um die beiden Oligonukleotid-Einzelstränge zu hybridisieren, um daraus ein doppelsträngiges sog. Insert zu gewinnen, wurden je 3 µl der beiden 100 pM konzentrierten Oligonukleotide zusammen mit 5 µl Puffer in ein 200 µl-Reaktionsgefäß pipettiert und auf einem Heizblock 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet und es wurde abgewartet, bis dieser wieder Raumtemperatur erreicht hatte. Vom vorbereiteten Plasmid, in welches das Insert eingebracht werden sollte, wurden 80 ng zusammen mit 1 µl des Hybridisierungs-Produkts, 3 µl 10X DNA-Ligationspuffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth), 1 µl T4-DNA-Ligase (dto.) und 23 µl H₂O über Nacht bei 16°C inkubiert. Am nächsten Tag konnte die klonierte DNA in kompetente Bakterien transformiert werden.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer	50 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl

2.2.1.7 QuikChange®, Einbauort-gezielte Mutagenese

Zur Unterbrechung der N/C-Interaktion des Androgenrezeptors wurde das N-terminale ²³FQNLF²⁷-Motif durch Austausch des ²³Phenylalanin durch ²³Alanin (F23A) via QuikChange® mit den Reagenzien von Stratagene, La Jolla, CA, USA mit pVP16-ARTAD(Q_x)-Plasmiden durchgeführt. Die Primer wurden derart gestaltet, dass anhand der DNA-Basen später **Alanin** die 23. Aminosäure bildete und bei Metabion GmbH (Martinsried) in Auftrag gegeben:

Vorwärts-Primer: 5' ACCTACCGAGGAGCT**GCC**CAGAATCTGTTCCAG 3'

Rückwärts-Primer: 5' CTGGAACAGATTCTG**GCC**AGCTCCTCGGTAGGT 3'

In ein 200 µl-PCR-Reaktionsgefäß wurde Folgendes pipettiert: 50 ng der jeweiligen Plasmid-DNA, jeweils 125 ng des Vorwärts- und Rückwärts-Primers und 1 µl 10 mM dNTP. Durch ddest. H₂O wurde ein Endvolumen von 50 µl erreicht, in welches anschließend 2,5 Einheiten PfuTurbo DNA-Polymerase gegeben wurden.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) mit folgendem Programm durchgeführt:

(1) 95°C, 30 sek, (2) 95°C, 30 sek, (3) 55°C, 1 min, (4) 68°C, 5 min. Die Schritte (2) – (4) wurden 16-mal wiederholt, sodass 16 Zyklen durchlaufen wurden. Nach der PCR wurde 10 Einheiten des Restriktionsenzym DpnI zugefügt, um bei 37°C für die Dauer von 1h die methylierte Ausgangs-DNA zu verdauen. Das PCR-Produkt konnte anschließend in kompetente Bakterien transformiert werden.

2.2.1.8 DNA-Transformation in kompetente Bakterien

Die verwendeten kompetenten DH5 α *E.coli*-Bakterien, gelagert bei -80°C, wurden auf Eis aufgetaut und typischerweise 50 μ l der Bakterien mit 5 μ l der zu transformierenden Plasmid-DNA (welche eine Ampicillin-Resistenz-Kassette beinhaltet) versehen. Nachdem die Mixtur durch vorsichtiges Anschnippen mit den Fingern gemischt worden war, wurde sie für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 sek bei 42°C auf einen Heizblock, gefolgt von einer 2-minütigen Inkubation auf Eis. Dann wurde die Bakterien mit 450 μ l SOC-Medium versehen und inkubierten bei 37°C unter Schütteln für ca. 1h. Danach konnten die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen werden, welche mit 100 μ g/ml des Antibiotikums Ampicillin versehen worden waren, sodass nur jene Bakterienkolonien überlebten, welche durch Transformation mit Plasmid-DNA Ampicillin-resistent geworden waren. Die DNA der Bakterienklone konnte anhand sog. „Mini“-Präparationen gewonnen und analysiert werden.

Bezeichnung	Zusammensetzung
SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose
Agarplatte	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 1,5 % (w/v) Agar (pulv.)

2.2.1.9 Plasmid-Präparation geringer DNA-Mengen, sog. „Mini“-Präparation

Die u. g. Lösungen wurden aus dem MaxiPrep-Kit von Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet.

Einzelne Bakterienkolonien wurden von der Agarplatte gepickt und über Nacht bei 37°C in einem Glasröhrchen in 3 ml autoklaviertem 1X LB-Medium, welches Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml beinhaltete, unter Schütteln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden knapp 1,5 ml der Flüssigkeit in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 12.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 150 µl P1-Lösung resuspendiert. Anschließend ruhte die Lösung 5 min bei Raumtemperatur, bevor 300 µl P2-Lösung zugefügt wurden. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden 225 µl P3-Lösung zugegeben und die Lösung gemischt. Nachdem das Bakterien-Lysat weitere 5 min auf Eis inkubiert hatte, wurde es 10 min bei 12.000 U/min und 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden neue Reaktionsgefäße mit 1 ml eiskaltem techn. Ethanol befüllt. Auf diese wurden 400 µl des Bakterien-Überstandes gegeben und nach kurzem Vortexen wurde die Plasmid-DNA durch eine ca. 15-minütige Zentrifugation bei 12.000 U/Min und 4°C gefällt. Das DNA-Sediment wurde zweimal mit 80%-igem (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und in 70 µl H₂O aufgenommen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl

2.2.1.10 Plasmid-Präparation großer DNA-Mengen, sog. „Maxi“-Präparation

Die u. g. Lösungen und Filter wurden aus dem MaxiPrep-Kit von Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet.

Einzelne Bakterienkolonien wurden von der Agarplatte gepickt oder eine kleine Menge aus der „Mini“-Präparation-Übernachtskultur in ca. 400 ml autoklaviertem 1X LB-Medium, welches das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml beinhaltete, über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung in Schraubverschluss-Gefäße bei 6.000 U/min und Raumtemperatur für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 10 ml P1-Lösung resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. 10 ml P2-Lösung wurden zum Lysieren der Bakterien zugefügt und die Gefäße vorsichtig geschüttelt. Nach der Zugabe von 10 ml Neutralisations-Lösung (P3) und erneutem Schütteln wurde das Bakterien-Lysat in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde auf eine mitgelieferte Säule, deren sich am Boden befindlicher Filter zuvor mit 15 ml QBT-Equilibrierungs-Lösung aktiviert worden war, gegeben. Nachdem die Zellsuspension die Säule und den Filter passiert hatte, wurde die Säule zum Waschen des Filters zweimal mit QC-Wasch-Lösung befüllt. Nachdem alle Flüssigkeit aus der Säule getropft war, wurde diese auf ein 50 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und mit 15 ml Elutions-Lösung befüllt. Die den Filter passierende Flüssigkeit enthielt nun die Plasmid-DNA, welche anschließend durch Zugabe von 11 ml Isopropanol, kurzem Vortexen und Zentrifugieren bei 4°C, 4.000 U/min, 15 min gefällt wurde. Das DNA-Sediment wurde zweimal mit 80 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in ca. 500 µl ddest. H₂O aufgenommen, die DNA-Konzentration bestimmt und die DNA-Lösung bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl

2.2.2 *Drosophila*

2.2.2.1 Haltung der Fliegen

Die Fliegenlinien wurden in durchsichtigen Polystyrol-Röhrchen mit Ceapren-Stopfen auf Standardfliegenfutter längerfristig bei 18°C, zu Versuchszwecken bei 25°C gehalten. Etwa alle zwei bis drei Wochen wurden die Fliegen auf frisches Futter umgesetzt. Zum Sammeln von Larven wurden adulte Fliegen in größere, mit Luftlöchern versehene Polystyrol-Röhrchen überführt, an deren offenes Ende eine austauschbare Apfelsaft-Agarplatte gesetzt wurde, welche mit einer Spatelspitze Hefesuspension (Frischhefe mit etwas 1X PBS anrühren) versehen worden war. Die Hefesuspension stimulierte die Fliegenweibchen zur Eiablage und diente neben dem Apfelsaft-Agar (s. 2.2.2.3) als Futter für die geschlüpften Larven.

2.2.2.2 Herstellung von Fliegenfutter

Zum Herstellen von Standardfliegenfutter wurden die Zutaten unter Rühren vollständig gelöst und zum Kochen gebracht. Nach dem Abkühlen auf ca. 65°C wurde zur Vermeidung von Verpilzung 10 %-iges Nipagin (w/v in techn. Ethanol) im Verhältnis 1:500 zugefügt. Vor dem Überführen des Futters in Polystyrol-Röhrchen wurden verschiedene Hormonzusätze beigemischt, welche jeweils in 80 %-igem (v/v) Ethanol gelöst waren. Falls nicht anders angegeben, enthielt das Futter 10⁻³ M DHT und/oder 10⁻² M Melatonin. Die Hormone waren recht hoch dosiert, da sie nicht direkt auf die Fliegen wirkten, sondern mit dem Futter erst den Verdauungstrakt passieren mussten (vgl. Pandey *et al.*, 2007, Nedelsky *et al.*, 2008, Funderburk *et al.*, 2008, Palazzolo *et al.*, 2010).

Bezeichnung	Zusammensetzung
Fliegenfutter	0,8 % (w/v) Fadenagar, 10 % (v/v) Zuckerrübensirup, 0,5 % (w/v) Bierhefe, 2,5 % (w/v) Maismehl

Hormon	Endkonzentration
Ethanol (Trägersubstanz der Hormone)	1,6 %
Dihydrotestosteron (DHT)	10^{-3} M
Melatonin	10^{-2} M
DHT + Melatonin	dto.
2-Phenylmelatonin (2-PM)	10^{-10} M
8-methoxy-2-propionamidotetralin (8-M-PDOT)	10^{-10} M
Melatonin (als Kontrolle für 8-M-PDOT und 2-PM)	10^{-10} M
6-Hydroxymelatonin (6-HM)	10^{-2} M

2.2.2.3 Kreuzungen von Fliegen

Das Modellieren verschiedener Fliegenlinien mit unterschiedlichem Androgenrezeptor-Hintergrund spezifisch in Motorneuronen erfolgte mithilfe des GAL4/UAS-Systems (Brand und Perrimon 1993). Dies wurde durch die Kreuzung zweier Fliegenstämme erreicht, wobei zum einen eine sog. Treiberlinie (hier: OK371-GAL4) verwendet wurde, welche das Protein des hefespezifischen Transkriptionsfaktors GAL4, unter Kontrolle eines Gen-spezifischen Promotors exprimiert, während die sog. Effektorlinie einen *Enhancer* enthielt, die sog. *Upstream Activating Sequence* (UAS), an welchen GAL4 spezifisch band und dadurch die Transkription stromaufwärts gelegener Ziel-Gene aktivierte (Abb. 2.2.2.1). Somit bestimmte die Treiberlinie den Ort der Genexpression, während die Effektorlinie das Produkt definierte. In der ersten Tochtergeneration waren zwar die UAS- und GAL4-Konstrukte in allen Zellen vorhanden, das Ziel-Gen wurde jedoch nur in denjenigen Zellen exprimiert, in welchen auch der Promotor spezifisch aktiviert war und damit das GAL4-Protein gebildet wurde. (Brand und Perrimon, 1993, Duffy, 2002). Der große Vorteil des GAL4/UAS-Systems ist die freie Kombinierbarkeit der Gewebe-spezifischen Treiberlinien mit den das Ziel-Gen tragenden UAS-Effektorlinien.

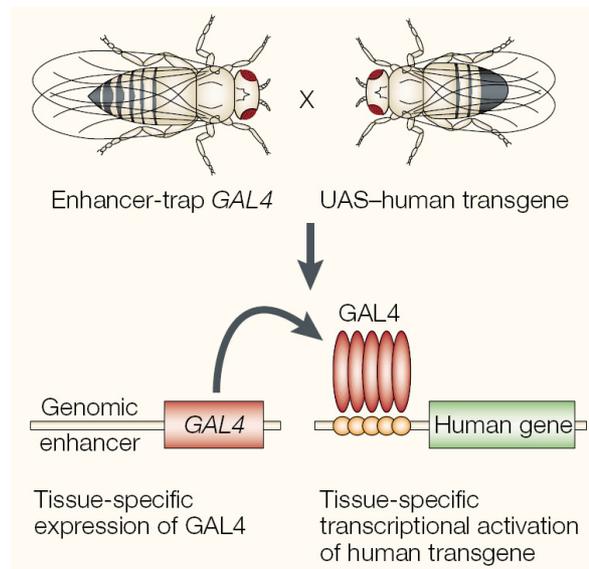


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des UAS-GAL4-Systems zur ektopischen Expression humaner Transgene in definierten Geweben oder Zelltypen in *Drosophila*

GAL4 ist ein hefespezifischer transkriptioneller Aktivator, welcher stromabwärts eines Zell- oder Gewebespezifischen Promotors platziert ist; das Transgen wird nur exprimiert, wenn GAL4 an die stromaufwärts gelegene UAS (*Upstream Activating Sequence*) bindet (im Schema als orangefarbene Kreise dargestellt) (aus Muqit und Feany, 2002)

Das Kreuzen der Fliegen erfolgte auf Apfelsaft-Agarplatten. Dazu wurde der autoklavierte Agar-Agar wieder vollständig zum Schmelzen gebracht und unter Rühren die weiteren Zutaten zugefügt. Das Gemisch kühlte auf ca. 65°C ab, bevor die Nipagin-Lösung zur Vermeidung von Verpilzung beigemischt wurde. Die Flüssigkeit wurde luftblasenfrei in Petrischalen gefüllt. Diese konnten anschließend einige Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agar-Agar	2,5 % (w/v) pulverförmiger Agar-Agar; autoklaviert
Apfelsaft-Agarplatten	25 % (v/v) Apfelsaft, 2,5 % (w/v) Haushaltszucker, 15 % (w/v)-iges Nipagin (in techn. EtOH) im Verhältnis 1:100 in Agar-Agar

Zum Kreuzen wurden weibliche Fliegenjungfrauen der OK371-GAL4 Treiberlinie und Männchen der UAS-AR Effektorlinien (ARQ1, ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) verwendet. Jungfrauen wurden gesammelt, indem alle adulten Fliegen aus einem Gefäß entfernt und im Laufe eines Tages in regelmäßigen Abständen die neu geschlüpften Imagines auf Weibchen untersucht wurden. Frisch geschlüpfte Weibchen zeichneten sich durch noch nicht ausgebreitete Flügel und einen dunkelgrünen Punkt (Meconium) auf der Ventralseite des Abdomens aus. Des Weiteren waren sie größer als reife Weibchen und ihrem Körper fehlte der typische Branton; sie sahen weiß bis grünlich aus. Da die Fliegen sehr schnell nach dem Schlüpfen ihre Geschlechtsreife erreichten, wurden die Fliegenjungfrauen einige Tage vor der Verkreuzung separat in einem kleinen Gefäß aufbewahrt um sicherzustellen, dass sie nicht bereits befruchtet gewesen waren.

Das Kreuzen der entsprechenden männlichen und weiblichen *Drosophila* erfolgte auf Apfelsaft-Agarplatten. Dazu wurden einige Männchen und ein 2-3-facher Überschuss an Weibchen zusammengesetzt. Nach max. 36h wurden die Platten mit den sich darauf befindenden Eiern und Larven ausgetauscht. Die auf der Platte liegenden Eier und Larven und die Hefe wurden mit einem Spatel abgenommen. Mit Hilfe eines Siebes und etwas Wasser wurden diese aus der Hefe gespült. Für weitere Analysen wurden Larven des ersten Larvenstadiums auf Futter mit unterschiedlichen Zusätzen (Ethanol, DHT und/oder Melatonin) überführt (s. 2.2.2.2). Je nach Versuch verblieben die Fliegenlarven in diesen Röhrchen, bis sie das dritte Larvenstadium erreicht hatten (immunhistochemische Färbungen) oder sich in Imagines verwandelt hatten (Überlebensanalysen, Lokomotionsanalysen).

2.2.2.4 Langzeit-Überlebensstudien

Um zu untersuchen, wie sich die langfristige Verabreichung des Hormons DHT auf das Überleben ARQ22- und ARQ65-exprimierender *Drosophila* auswirkte, wurden AR-transgene Fliegen mithilfe des UAS-GAL4-Systems etabliert (2.2.2.3). Nach dem Schlüpfen aus dem Ei wurden die ARQ22- bzw. ARQ65-exprimierenden Larven in Polystyrol-Röhrchen überführt, welches Futter enthielt, dem entweder Ethanol (Kontrolle) oder DHT beigemischt worden war. Nachdem sich die Larven zu adulten Fliegen verpuppt hatten, wurden jeweils 50 männliche bzw. weibliche Imagines gesammelt und in neue Röhrchen, welche jeweils dieselben Futterzusätze enthielten, überführt. Die Futtergefäße wurden alle 3-4 Tage gewechselt. Die Anzahl toter Fliegen wurde täglich erfasst und die Überlebensrate prozentual errechnet.

2.2.2.5 Lokomotionsstudien

Zur Untersuchung, wie sich die Verabreichung verschiedener Hormon-Kombinationen auf den Phänotyp der verwendeten Fliegenmodelle auswirkte, wurden die Tiere nach 2.2.2.3 gekreuzt und anschließend jeweils 50 frisch geschlüpfte Fliegenlarven in die Mitte des Futters mit den gewünschten Hormonzusätzen (DHT und/oder Melatonin) bzw. auf Kontrollfutter (Ethanol) gesetzt. Zur Bewertung der Auswirkungen der Hormonzusätze auf transgenen Fliegen, welche unterschiedliche AR-Konstrukte spezifisch in Motoneuronen exprimierten, wurde das Bewegungsverhalten der Larven analysiert. Dazu wurden diejenigen Larven gezählt, welche die Wand des Polystyrol-Röhrchens hoch gewandert waren und sich dort verpuppt hatten. Fliegenlarven bzw. -puppen, welche im Futter verblieben, wurden für diese Evaluierung außer Acht gelassen.

2.2.2.6 Kurzzeit-Überlebensstudien

Einhergehend mit den Lokomotionsanalysen aus 2.2.2.5 wurde die Überlebensrate der AR-transgenen *Drosophila* vom ersten Larvenstadium bis zum geschlüpften Imago untersucht. Dazu wurden ca. einen Tag nach dem Schlüpfen die im Futtergefäß gefundenen adulten *Drosophila* gezählt und die Überlebensrate ermittelt.

Für spätere Western Blot Analysen wurden diese adulten Fliegen anschließend in einem Gefäß gesammelt, auf Trockeneis getötet und bei -80°C bewahrt.

2.2.2.7 Herstellung von Proteinlysaten aus *Drosophila*-Köpfen

Die AR-transgenen Fliegen des jeweiligen Phänotyps (Kreuzung aus Treiber- und Effektorlinie, aufgezogen auf Futter mit den entsprechenden Hormonzusätzen) wurden mit Kohlenstoffdioxid betäubt und in einem Gefäß gesammelt, in welchem sie anschließend auf Trockeneis getötet wurden. Das Abtrennen der Köpfe erfolgte ebenfalls auf Trockeneis und mithilfe einer Pinzette und einer Rasierklinge; es wurden jeweils 100 Köpfe gesammelt. Anschließend wurden die Köpfe in 1 µl/Kopf RIPA-Puffer mithilfe eines Glasstabes zerkleinert und das Homogenisat 3 x 10 sek mit Ultraschall behandelt, bevor es 5 min bei 4°C und 14.000 U/min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, das Sediment in der gleichen Menge RIPA-Puffer resuspendiert und die genannten Schritte wiederholt. Der durch das Zentrifugieren entstandene Überstand wurde dem bereits gesammelten hinzugefügt und die Proteinkonzentration anhand des Bradford-Verfahrens ermittelt. Die Proteinlysate konnten für Western Blot-Analysen verwendet werden. Falls notwendig, wurden die Lysate bei -80°C gelagert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 % (v/v) Triton; 0,5 % (w/v) NaDOC; 400 mM NaCl; 0,1 % (w/v) SDS; 2 mM EDTA; 1:200 PIC

2.2.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zum Ermitteln des Proteingehalts der hergestellten Kopflysate von AR-transgenen *Drosophila* wurde das sog. Bradfordverfahren (Bradford, 1976) angewandt. Typischerweise wurde 1 µl des Lysats zu 1 ml 1X „Bradford-Reagenz“ (Protein Assay 5X Farbstoff-Konzentrat, Bio-Rad, München) zugefügt. Zum Herstellen einer Eichgeraden wurde 1 ml 1X Bradford-Reagenz mit zunehmenden Mengen an BSA-Lösung versetzt. Für den Nullwert wurde RIPA-Puffer verwendet. Jeweils 200 µl der Lösung wurden auf eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen überführt und die Optische Dichte bei 595 nm gemessen (ELx 808 iu Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc., Bad Friedrichshall). Mithilfe einer Standard-Kurve wurde der Proteingehalt ermittelt.

2.2.2.9 Größenauftrennung von Proteinen mittels von SDS-PAGE

Zur größenmäßigen Auftrennung eines Proteingemisches wurde die sog. SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis*) durchgeführt (Raymond und Weintraub, 1959). Es wurden 10 % SDS-Gele verwendet, welche folgendermaßen hergestellt wurden: Das Trenngel wurde zu 4/5 in den Gießstand eingefüllt und mit 80 %-igem (v/v) Ethanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Ethanol mithilfe eines Filterpapiers entfernt und das Gel mit etwas ddest. H₂O gewaschen. Anschließend wurde ein Kamm mit entsprechender Taschengröße eingesetzt und mit 5 %-igem Sammelgel aufgefüllt. Nachdem das Gel vollständig polymerisiert war, wurde es in der dafür vorgesehenen Apparatur fixiert und mit 1X Laemmli-Puffer überschichtet. Bevor die Taschen des Gels mit den Proben geladen werden konnten, wurden diese im Verhältnis 1:1 mit 2X Proteinsammelpuffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt, kurz auf Eis gelagert und zentrifugiert. Die SDS-PAGE erfolgte typischerweise bei ca. 90-125 V.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Trenngel (10 %)	11,7 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8, 9,9 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30:0,8; 8,4 ml ddest. H ₂ O, 150 µl 20 % (w/v) SDS, 300 µl 10 % (w/v) APS, 15 µl TEMED
Sammelgel (5 %)	690 µl 1 M Tris-HCl pH 6,8, 1,60 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30:0,8, 7,3 ml ddest. H ₂ O, 56 µl 20 % (w/v) SDS, 45 µl 10 % (w/v) APS; 15 µl TEMED
1X Laemmli-Puffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
2X Proteinsammel-puffer	73,48 % H ₂ O, 12,52 % (v/v) 1 M Tris-HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, einige Körnchen Bromphenolblau (pulverf.)

2.2.2.10 Western Blot Analysen

Nachdem die Proteine mithilfe von SDS-PAGE aufgetrennt waren, wurden sie in einem senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feld auf eine mit Methanol getränkte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran bei 110 V und ca. 250-300 mA für mehrere Stunden bei 4°C in einer entsprechenden Apparatur in Transferpuffer übertragen (Towbin *et al.* 1979). Die daran anschließende Immundetektion wurde jeweils auf das nachzuweisende Protein abgestimmt. Generell wurde jedoch folgendermaßen verfahren: Die Membran wurde 3 x 5 min mit 0,05 % PBST-Waschlösung gewaschen und anschließend für 1h in Blockierlösung inkubiert. Daraufhin konnte die Membran direkt mit dem entsprechenden Primärantikörper behandelt werden, da dieser in der Blockierlösung verdünnt wurde. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für mindestens 3h, i. d. R. jedoch über Nacht bei 4°C. Nachdem die Membran nachfolgend 3 x 5 min mit Waschlösung gewaschen worden war, erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten (*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) Sekundärantikörper, der vom zuvor verwendeten Primärantikörper abhing. Der sekundäre Antikörper wurde in Blockierlösung verdünnt, zum Binden an das Epitop des Primärantikörpers waren 1-3 h bei Raumtemperatur ausreichend oder die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Bevor die untersuchten Proteine nun durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden konnten, musste die Membran ein weiteres Mal 3 x 5 min mit Waschlösung gewaschen werden. Die Chemilumineszenz trat ein, wenn die Membran mit kommerziell erhältlicher sog. ECL Western Blot-Detektionsreagenz inkubiert wurde. Dazu wurden zwei Lösungen zu gleichen Teilen gemischt, diese banden an die Meerrettichperoxidase

des sekundären Antikörpers und es fand eine chemische Reaktion statt, bei welcher Elektronen aus einem angeregten in einen energieärmeren Zustand übergangen. Dabei wurde Licht emittiert, womit anschließend ein ECL-Hyperfilm® belichtet wurde. Die Expositionszeit war dabei abhängig von der auf der Membran gebundenen Proteinmenge und vom verwendeten Primärantikörper und variierte zwischen wenigen Sekunden (α -Tubulin) und mehreren Minuten (Androgenrezeptor).

Bezeichnung	Zusammensetzung
Transferpuffer	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,05 % (w/v) SDS
PBST-Waschlösung	0,05 % (v/v) Tween-20 in 1X PBS
Blockierlösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in 0,05 % PBST

Primäre Antikörper	Verdünnung (in Blockierlösung)
anti-AR (F39.4.1) (Maus)	1:1000
anti- α -Tubulin (H-300) (Maus)	1:2000
Sekundäre Antikörper	Verdünnung (in Blockierlösung)
Ziege Anti-Maus-HRP	1:2000

2.2.2.11 Präparation von Fliegenlarven für anschließende immunhistochemische Färbung der neuromuskulären Verbindung

Wandernde Larven des dritten Larvenstadiums, die den zu untersuchenden Phänotyp aufwiesen, wurden in einer kleinen Petrischale gesammelt, mit etwas Wasser oder einem Tuch gesäubert und für kurze Zeit auf Eis betäubt. Anschließend wurde eine Larve mit zwei Mikronadeln auf einer Silikon-Platte fixiert, indem die Larve mit der Dorsalseite nach oben auf der Platte so positioniert wurde, dass die paarigen Trachealstränge mittig lagen. Das anteriore und posteriore Ende wurde jeweils feststeckt und mit ein wenig physiologischer, Hämolymphe-ähnlicher HL3-Lösung (nach Stewart *et al.*, 1994) bedeckt. Die Kutikula wurde am posterioren Ende vorsichtig mit einer Mikroschere angeschnitten, danach wurde die Larve mithilfe der Mikroschere vom posterioren zum anterioren Ende hin zwischen den beiden Trachealsträngen an der

dorsalen Mittellinie geöffnet und dabei beachtet, dass die Schere die Ventralseite der Larve nicht berührte, da hier der Innenseite der Kutikula die zu untersuchenden Muskelfasern auflagen. Die geöffnete Larve wurde mit vier weiteren Mikronadeln fixiert, jeweils zwei an jeder Seite, sodass ein „Filet“ entstand, bevor vorsichtig mithilfe einer Pinzette Urogenitalsystem und Fettkörper entfernt wurden. Die HL3-Lösung der so präparierten Larve wurde abgenommen und durch PFA ersetzt, in welchem das Filet 30-60 min fixierte. Anschließend wurde es vorsichtig in ein mit 0,1 % PBST versehenes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Präparat wurde 3 x 5 min gewaschen und 1h in 0,3 % PBST permeabilisiert, im Anschluss erfolgte die immunhistochemische Färbung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
HL3-Lösung	70 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 10 mM NaHCO ₃ , 5 mM Trehalose, 115 mM Saccharose, 5 mM HEPES, 1 mM CaCl ₂
PFA	4 % (w/v) PFA in 0,1 % PBST; zum Lösen auf 60°C erhitzt
0,1 % PBST	0,1 % (v/v) Triton X 100 in 1X PBS
0,3 % PBST	0,3 % (v/v) Triton X 100 in 1X PBS

2.2.2.12 Immunhistochemische Färbung der neuromuskulären Verbindung von *Drosophila*-Larven

Die fixierten und gewaschenen *Drosophila*-Filets wurden für mindestens 1h in 1 ml 10 % (v/v) NGS (Ziegen-Serum, *normal goat serum*) blockiert, in welches direkt im Anschluss 5 µl des CyTM5-gekoppelten AffiniPure Ziege-anti-Meerrettichperoxidase-Antikörpers (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, England) zum Markieren neuronaler Strukturen (Jan und Jan, 1982) gegeben wurden. Die Inkubation erfolgte rotierend über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Filets 3 x 5 min und 1 x 1h mit 0,3 % PBST gewaschen, bevor sie auf einem Objektträger in Polyvinylalkohol eingebettet und mit einem Deckglas versehen wurden. Bevor die Präparate unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet werden konnten, sollten sie mindestens 2 Tage ruhen, damit das Eindeckmedium trocknen und aushärten konnte. Zudem wurden unspezifische Signale schwächer und die spezifischen traten deutlicher hervor. Untersucht wurden jeweils die

neuromuskulären Verbindungen, welche das Muskelpaar 6/7 im vierten Abdominalsegment innervierten.

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,3 % PBST	0,3 % (v/v) Triton X 100 in 1X PBS
10 % NGS	10 % (v/v) NGS in 0,3 % PBST
Eindeckmedium	24 ml Glycerin; 9,6 g Mowiol®; 24 ml H ₂ O; 48 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,5

2.2.3 Zellkultur (*Spodoptera frugiperda*, Sf9)

2.2.3.1 Passagierung von Sf9 Zellen

Zellen von *Spodoptera frugiperda* (Sf9) wurden in 550 ml-Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) in 35 ml Zellkultur-Medium (Sf-900™ III SFM, Gibco, Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt) in einem Inkubator bei 27°C gehalten. Nachdem die Zellen 80-90 % Konfluenz erreicht hatten, wurden sie geteilt, indem die Sf9 Zellen im Medium durch Auf- und Abpipettieren in Suspension gebracht wurden und davon ca. 10 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt wurden, zu welcher 25 ml frisches Medium gegeben wurden. Die Zellen wurden nach maximal 33 Passagen verworfen und durch frisch aufgetaute ersetzt.

2.2.3.2 Auftauen und Einfrieren von Sf9 Zellen

Zum längerfristigen Aufbewahren von Sf9 Zellen wurden diese auf einer 550 ml-Zellkulturflasche in 35 ml Medium hochgezogen, bis sie eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatten. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Sf9 Zellen vom Boden der Flasche gelöst und in Suspension gebracht. Die Zellen wurden in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 1.000 U/min für 3 min zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes (konditioniertes Medium) wurde zur Herstellung des Einfriermediums verwendet. Der restliche Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in 1-2 ml Einfriermedium aufgenommen und in Cryo-Gefäße überführt. In einem Einfrierbehälter wurden die Sf9 Zellen langsam auf -80°C abgekühlt und konnten anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Zum Auftauen der Sf9 Zellen wurden die Cryo-Gefäße im Wasserbad bei 27°C erwärmt, bis das Einfriermedium wieder flüssig war. Anschließend wurden die Zellen unverzüglich in 250 ml-Zellkulturflaschen überführt, welche mit ca. 20 ml Zellkultur-Medium versehen worden waren. Nachdem die Zellen angewachsen und konfluent

waren, wuchsen sie auf 550 ml-Zellkulturflaschen in 35 ml Medium, wo sie ab Passage 4-5 für Experimente verwendet werden konnten.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Einfríermedium	45 % (v/v) konditioniertes Medium, 45 % (v/v) frisches Zellkultur-Medium, 10 % (v/v) DMSO

2.2.3.3 Infektion von Sf9 Zellen

Verschiedene sog. Inkolums, welche Bacmid-DNA zur Expression verschiedener AR-Konstrukte (ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) nach dem Bac-to-Bac® Baculovirus Expressionssystem (Invitrogen, Karlsruhe) enthielten, waren bereits im Labor vorhanden und wurden freundlicherweise von Dr. Tobias Jochum und Rebecca Seeger zur Verfügung gestellt. Die Inkolums wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Zur Infektion, die ebenfalls im Dunkeln erfolgte, wurden typischerweise ca. 6×10^6 Sf9 Zellen in 5 ml Zellkultur-Medium in Zellkulturflaschen mit einem Fassungsvermögen von 40 ml ausgesät. Nachdem sich die Zellen auf den Boden der Zellkulturflasche abgesetzt hatten, wurden sie mit 430 µl des Inkolums, welche Bacmid-DNA zur Expression der entsprechenden Androgenrezeptor-Konstrukte enthielt, infiziert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Sf9 Zellen in einem Zellkultur-Inkubator bei 27°C aufbewahrt.

2.2.3.4 Bestimmung der Wachstumsrate infizierter Sf9 Zellen

Zur Bestimmung der Wachstumsrate nach 0, 24 bzw. 72h Infektion wurde pro Infektion und Messzeitpunkt jeweils eine 40 ml-Zellkulturflasche mit 6×10^6 Sf9 Zellen in 5 ml Medium ausgesät. Nachdem sich die Zellen auf den Boden der Zellkulturflasche abgesetzt hatten, wurden sie mit 430 μ l des Inkolums, welche Bacmid-DNA zur Expression der entsprechenden Androgenrezeptor-Konstrukte (ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) enthielt, infiziert. Zur Kontrolle wurden zudem Sf9 Zellen ausgesät und nicht infiziert. Kurz nach der Infektion wurden die Sf9 Zellen durch Auf- und Abpipettieren vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in Suspension gebracht. Jeweils 1×10^4 Zellen in 100 μ l Medium wurden in Triplikaten auf Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät. Für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt wurde eine separate Platte vorbereitet und bis zur Auswertung mit Parafilm verschlossen, um eine Entweichung des Mediums zu verhindern, und in einem Zellinkubator bei 27°C aufbewahrt. Die Wachstumsrate wurde zum jeweiligen Zeitpunkt der Analyse mithilfe von Celltiter Blue® (Promega, Mannheim) ermittelt. Dazu wurden die Zellen im Verhältnis 1:6 mit der Celltiter Blue®-Reagenz versehen. Das Prinzip basiert darauf, dass metabolisch aktive Zellen den blauen Redox-Farbstoff Resazurin durch Reduktion irreversibel in den pink- bis rosa-farbenen, fluoreszenten Farbstoff Resorufin umsetzten, wohingegen tote oder sterbende Zellen kein fluoreszentes Signal erzeugten (nach www.promega.com). Nach einer Inkubationszeit von 4h bei 27°C im Dunkeln erfolgte die Messung des Signals mithilfe eines Fluorometers (FLUOstar OPTIMA Fluorometer, BMG Labtechnology, Offenburg) bei 540 nm Extinktion und 580 nm Emission und einer Verstärkung von 1400. Die Wachstumsrate der Zellen wurde aus den gemittelten Triplikaten-Messwerten pro Infektionsansatz jeweils in Relation zum bei 0h Infektion ermittelten Messwert erstellt.

2.2.3.5 Ermittlung der Viabilität infizierter Sf9 Zellen nach Hormonbehandlung

Zur Ermittlung der Viabilität der Zellen nach 24-stündiger Hormonbehandlung nach 72h Infektion wurden jeweils ca. 6×10^6 Zellen in 5 ml Medium in 40 ml-Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden jeweils mit 430 μ l AR-Inkolum infiziert bzw. zur Kontrolle nicht infiziert. Pro Infektionsdauer und Inkolum wurde jeweils eine Zellkulturflasche angesetzt. Nach 72h Infektion wurden die Zellen jeweils durch Auf- und Abpipettieren in Suspension gebracht und 1×10^4 Zellen pro 100 μ l Medium mit Ethanol (Kontrolle), DHT und/oder Melatonin behandelt und in Triplikaten auf Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät. Die Zellen verblieben für 24h in einem Inkubator bei 27°C und wurden anschließend im Verhältnis 1:6 mit Celltiter Blue ®-Reagenz versehen (vgl. 2.2.3.4), um nach weiteren 4h Inkubation die Viabilität der Zellen zu messen. Zur Ermittlung toxischer Effekte wurden DHT und/oder Melatonin behandelten Zellen pro AR-Infektion jeweils in gemittelten Triplikaten-Messwerten in Relation zur Kontrollbehandlung mit Ethanol gesetzt.

Hormon	Endkonzentration
Ethanol (Trägersubstanz der Hormone)	0,008 %
Dihydrotestosteron (DHT)	10^{-4} M
Melatonin	10^{-3} M
DHT + Melatonin	dto.

2.2.3.6 Herstellung von Proteinlysaten für Western Blot Analysen

Zur Ermittlung des Expressionsniveaus des Androgenrezeptors nach 24 bzw. 72h Infektion wurden jeweils ca. 6×10^6 Zellen in 5 ml Medium in Zellkulturflaschen mit einem Fassungsvermögen von 40 ml ausgesät und mit jeweils 430 μ l Bacmid-DNA-beinhaltendem Inkolum zur Expression verschiedener Androgenrezeptor-Konstrukte (ARQ11, ARQ65, ARQ22dm) infiziert bzw. zur Kontrolle nicht infiziert. Pro Infektionsdauer und AR-Konstrukt wurde jeweils eine individuelle Flasche angesetzt. Nach ein und drei Tagen wurden die Sf9 Zellen geerntet, indem die Flaschen für 10 min

auf Eis inkubiert und anschließend die Zellen durch Auf- und Abpipettieren wieder in Suspension gebracht und diese dann in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt wurden. Nach einer 6-minütigen Zentrifugation bei 2000 U/min, 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Zellsediment in 1 ml kaltem PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in 300 µl HEPES-Lysispuffer resuspendiert und für anschließende Western Blot Analysen verwendet.

Bezeichnung	Zusammensetzung
HEPES-Lysispuffer	20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM ZnCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM NaVO ₃ , 1:50 PIC

Primäre Antikörper	Verdünnung (in Blockierlösung)
anti- AR (F39.4.1) (Maus)	1:1000
anti- α -Tubulin (H-300) (Maus)	1:2000
Sekundäre Antikörper	Verdünnung (in Blockierlösung)
Ziege-Anti-Maus-HRP	1:2000

2.2.4 Zellkultur (COS-7)

2.2.4.1 Passagierung von COS-7 Zellen

COS-7 Zellen wurden bei 37°C in 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Zell-Inkubator in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) + 10 % (v/v) FCS gehalten. Die Zellen wuchsen in Petrischalen oder Zellkulturplatten mit Vertiefungen unterschiedlicher Größe abhängig von der jeweiligen nachfolgenden Verwendung. Die Zellen wuchsen bis zu einer Konfluenz von maximal 60 % und wurden anschließend geteilt, indem die Zellen mit 1X PBS gewaschen und anschließend mit 0,25 % Trypsin + EDTA (Gibco, Invitrogen) behandelt wurden, um sie vom Boden der Petrischale zu lösen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf neue Platten ausgesät.

2.2.4.2 Einfrieren und Auftauen von COS-7 Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden COS-7 Zellen mit 1X PBS gewaschen, mit Trypsin behandelt und anschließend in 1X PBS aufgenommen und 3 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen in Einfriermedium aufgenommen und in ein Cryo-Gefäß überführt. In einem Einfrierbehälter wurden die Zellen langsam auf -80°C heruntergekühlt und nach ca. einer Woche zur Endlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Cryo-Gefäße in einem 37°C warmen Wasserbad gerade so lange inkubiert, bis das Zellmedium aufgetaut war. Anschließend wurden die Zellen in DMEM + 10 % (v/v) FCS aufgenommen und bei 37°C in einem Zellinkubator aufbewahrt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Einfriermedium	70 % (v/v) DMEM, 20 % (v/v) FCS, 10 % (v/v) DMSO

2.2.4.3 Transiente Transfektion von COS-7 Zellen

Für Zellfraktionierungen wurden 8×10^4 COS-7 Zellen auf Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät und 24h in 2 ml Hungermedium gehungert. Pro Vertiefung wurden die Zellen mit 2 μg des pSG5AR(Q_x)-Expressionsvektors und 1 μl FuGene® (Promega, Mannheim) laut Herstellerprotokoll in 100 μl DMEM für 48h transfiziert und anschließend für die Dauer von 3h mit Hormon behandelt.

Für immunhistochemische Färbungen wurden 5×10^4 COS-7 Zellen auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und 24h in 1 ml Hungermedium gehungert. Pro Vertiefung wurden die Zellen mit 1 μg des pSG5AR(Q_x)-Expressionsvektors und 2 μl GeneJuice® (Merck Biosciences, Darmstadt) in 50 μl DMEM laut Herstellerprotokoll für die Dauer von 24h transfiziert, bevor sie im Anschluss für unterschiedliche Zeiten mit Hormon behandelt wurden.

Zu N/C-Interaktionsstudien des AR mithilfe des *Mammalian Two-Hybrid Systems* wurden 1×10^5 COS-7 Zellen pro Vertiefung mit 0,5 μg pVP16-ARTAD(Q_x) + 0,2 μg hAR LBD GAL4 DBD + 0,8 μg pSG Δ E4-38-luc + 0,1 μg *Renilla*-tk-luc + 2,5 μl GeneJuice® in 100 μl DMEM in 2 ml Medium laut Herstellerprotokoll transfiziert. Nach 24h Transfektion wurden die Zellen für weitere 16h mit Hormon behandelt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kulturmedium	10 % (v/v) FCS in DMEM
Hungermedium	3 % (v/v) CCS (durch Aktivkohle filtrierte, inaktivierte FCS) in DMEM

Hormon	Endkonzentration
Ethanol (Trägersubstanz der Hormone)	0,008 %
Dihydrotestosteron (DHT)	10^{-7} M
Melatonin	10^{-6} M
DHT + Melatonin	dto.

2.2.4.4 Fraktionierungen von COS-7 Zellen

Um COS-7 Zellen in ihren nukleären und zytoplasmatischen Anteil zu trennen, wurden Zellfraktionierungen mithilfe des NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents-Kits (Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt.

Dazu wurden 8×10^4 COS-7 Zellen auf Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. Nachdem die Zellen für 24h starviert und weitere 48h transfiziert worden waren, wurden sie für 3h mit Ethanol (Kontrolle), DHT und/oder Melatonin behandelt. Anschließend wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen und jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte fanden auf Eis statt. Die Zellen wurden 2-3 min bei 4°C, 3.500 U/min abzentrifugiert und der Überstand entnommen, sodass das Zellsediment so trocken wie möglich war. Dieses wurde dann in 200 µl CER I resuspendiert und 15 sek auf höchster Stufe vorgetext. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden anschließend 11 µl CER II zugegeben und 5 sek auf höchster Stufe gevortext und erneut 1 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Vortexen für 5 sek wurde das Zellysate 10 min bei 4°C, 12.000 U/min zentrifugiert. Unverzüglich wurde der Überstand, welcher die zytoplasmatische Fraktion darstellte, abgenommen und in ein neues, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Das Zellsediment wurde in 100 µl NER resuspendiert und anschließend 15 sek auf höchster Stufe gevortext und auf Eis inkubiert. Diese wurde für die Dauer von 40 min alle 10 min wiederholt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C, 12.000 U/min. Sofort danach wurde der Überstand, welcher die nukleäre Fraktion darstellte, abgenommen und in ein neues, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration der Zytoplasma- und Zellkernextrakte konnte mithilfe des Bradford-Verfahrens (vgl. 2.2.2.8) ermittelt werden. Bis zur Analyse der Fraktionierungen mittels Western Blot Analysen konnten die Fraktionen bei -80°C gelagert werden.

Hormon	Endkonzentration
Ethanol (Trägersubstanz der Hormone)	0,008 %
Dihydrotestosteron (DHT)	10^{-7} M
Melatonin	10^{-6} M
DHT + Melatonin	dto.

2.2.4.5 Immunhistochemische Färbung von COS-7 Zellen

Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen wurden mit runden Deckgläsern mit einem Durchmesser von 12 mm bestückt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurden 1×10^4 COS-7 Zellen in DMEM + 10 % (v/v) FCS ausgesät und transfiziert. Die Hormonbehandlung erfolgte im Anschluss für unterschiedliche Zeiten (30 min, 3h oder 6h).

Nach der Hormonbehandlung wurden die Zellen 2x mit 1X PBS gewaschen und anschließend 10 min mit PFA fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen für 5 min in 0,1 % TBS. Erneut wurden die Zellen gewaschen, bevor eine halbstündige Inkubation in Blockierlösung erfolgte. Direkt im Anschluss wurden die Zellen mit dem Primärantikörper für ca. 3h bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurden die Zellen wieder gewaschen und für 1h mit dem Sekundärantikörper sowie mit Draq5™ zum Färben der Zellkerne behandelt. Zum Schluss wurden die Zellen mit 1X PBS und anschließend mit Wasser gewaschen, die Deckgläschen mithilfe einer Pinzette aus den Vertiefungen der Zellkulturplatte genommen und auf einen mit Tropfen Polyvinylalkohol-Eindeckmedium besetzten Objektträger gesetzt. Zum Trocknen wurden diese über Nacht im Dunkeln im Kühlschrank gelagert und frühestens am nächsten Tag an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (LSM 510 META, Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) untersucht und ausgewertet, wobei die Färbung mit Draq5™ der Orientierung diente, um die subzelluläre Lokalisation des Androgenrezeptors innerhalb der Zellen zu bestimmen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
PFA	4 % (w/v) PFA in 1X PBS; zum Lösen auf 60°C erhitzt
0,1 % TBS	1X PBS + 0,1 % (v/v) Triton X-100
Blockierlösung	1 % (w/v) BSA, 1 % (v/v) NGS in 1X PBS
Eindeckmedium	24 ml Glycerin, 0,6 g Mowiol®, 24 ml H ₂ O, 48 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,5

Primärantikörper	Verdünnung (in Blockierlösung)
anti- AR (F39.4.1) (Maus)	1:250
Sekundärantikörper	Verdünnung (in Blockierlösung)
Alexa Fluor® 488 Ziege-anti-Maus	1:500
Draq5™	1:1000

2.2.4.6 Messung der Glühwürmchen-Luziferase-Aktivität transient transfizierter COS-7 Zellen

Nach der Transfektion wurden die Zellen 16h mit Hormon (s. 2.2.4.3) behandelt und anschließend 2x mit 1X kaltem PBS gewaschen, bevor die Zellen mit 200 μ 1X Lyse-Puffer (Passive Lysis Buffer, Promega, Mannheim, Deutschland) geerntet wurden. Dazu wurde der Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Zum Ernten wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Jeweils 20 μ l des Zelllysats wurden in Triplikaten auf eine weiße Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Mittels Autoinjektion wurden pro Vertiefung 70 μ l Messpuffer und 30 μ l Luziferin-Messlösung zugegeben und die Luziferase-Aktivität in einem VICTOR™ Light 1420 Luminescence Counter (PerkinElmer, Rodgau) gemessen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Messpuffer	1 mM DTT, 1 mM ATP in Glycylglycinpuffer
Glycylglycinpuffer	25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO ₄ , 4 mM EGTA
Luziferin-Messlösung	1 mM Glühwürmchen-Luziferin

2.2.4.7 Messung der *Renilla*-Luziferase-Aktivität transient transfizierter COS-7 Zellen

20 µl des Zellysats wurden mittels Autoinjektion mit 100 µl der Coelenterasin enthaltenden Substratlösung vermischt und die Lumineszenz-Aktivität in einem VICTOR™ Light 1420 Luminescence Counter (PerkinElmer, Rodgau) gemessen. Zur Auswertung wurde der jeweilige Luziferase-Wert durch den *Renilla*-Luziferase-Wert dividiert und dadurch normalisiert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coenlerasin-Puffer	0,1 M KPi-Puffer, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,6
KPi-Puffer	0,2 M KH ₂ PO ₄ , 0,2 M K ₂ HPO ₄ , pH 7,6
Substratlösung	25 nM Endkonzentration Coenlerasin (Byosinth AG, Gstaat, Schweiz)

2.2.5 Hormon-Bindestudie

Zur Untersuchung, ob Melatonin an die Ligandenbindedomäne (LBD) des Androgenrezeptors binden würde, wurde eine sog. Hormon-Bindestudie mithilfe des PolarScreen™ Androgen Receptor Competitor Assay, Green Protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt.

Das Prinzip dieses Experiments basierte darauf, dass ein mitgelieferter fluoreszenter Androgenrezeptor-Ligand (Fluormone™ AL Green) mit der Liganden-Bindedomäne des AR einen Komplex bildete, welcher anschließend zu einem hohen Polarisationsignal führte. In Anwesenheit einer bestimmten Substanz, welche um die Liganden-Bindedomäne konkurrierte und eine höhere Affinität für diese besaß, wurde das fluoreszente Fluormone™ AL Green aus dem Komplex verdrängt und führt zu einem niedrigen Polarisationsignal, wenn es sich frei in Lösung befand.

Zum Etablieren des Systems wurde das Polarisationsignal in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des affinen AR-Liganden DHT durchgeführt; zur Negativkontrolle wurde Dexamethason verwendet, welches nicht an die LBD des AR binden sollte. Gleichzeitig wurden verschiedene Konzentrationen des Hormons Melatonin eingesetzt werden, um zu untersuchen, ob dieses an die LBD binden würde.

Die Messungen wurden in einer schwarzen Zellkulturplatte mit 384 quadratischen Vertiefungen durchgeführt. Je 20 µl der 2-fach konzentrierten Lösung, welche verschiedene Konzentrationen an DHT, Dexamethason oder Melatonin enthielt, und 20 µl der 2-fach konzentrierten AR-LBD/Fluormone™ AL Green Mixtur wurden in mitgeliefertem AR Green Assay Puffer, welcher zuvor mit 2 µl 1 M DTT/1 ml versehen wurde, in Triplikaten in die Vertiefungen der Platte aufgetragen, sodass am Ende in jeder Vertiefung 40 µl einer 1-fach konzentrierten Reaktionslösung waren, welche 25 nM AR-LBD und 1 nM Fluormone™ AL Green beinhaltete. Die zu untersuchenden Test-Substanzen (DHT, Dexamethason, Melatonin) wurden dazu aus einer 10^{-1} M (Melatonin) bzw. 10^{-2} M (DHT, Dexamethason) Stocklösung schrittweise in AR Green Assay Puffer verdünnt. Als Nullwert zur Ermittlung der Hintergrundstrahlung diente mit DTT komplettierter AR Green Assay Puffer, als Negativkontrolle (niedriger Polarisations-Messwert) wurde AR Green Assay Puffer + 2 nM Fluormone™ AR Green eingesetzt.

Der Ausgangswert mit einem hohen Polarisations-Messwert wurde durch Messung der 1X AR-LBD/Fluormone™ AL Green-Lösung ohne Hormonzugabe erhalten.

Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Polarisationswerte an einem infinite F200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich) nach einer Inkubationszeit von 4h bei Raumtemperatur mit einem Interferenz-Filter bei 485 nm Extinktion und 535 nm Emission gemessen.

Lösung	Zusammensetzung
2X Test-Substanz-Lösung	Mit DTT komplettierter AR Green Assay Puffer, der verschiedene Konzentrationen der Hormone DHT, Dexamethason oder Melatonin enthielt.
2X AR-LBD/ Fluormone™ AL Green-Lösung	Mit DTT komplettierter AR Green Assay Puffer, der 50 nM AR-LBD und 2 nM Fluormone™ AL Green enthielt.

3 Ergebnisse

3.1 *Drosophila* als Modellorganismus von SBMA

Zur Erforschung neurodegenerativer Krankheiten kommt schon lange die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* erfolgreich zum Einsatz (s. Review Marsh und Thompson, 2006, Review Hirth, 2010, Rossetto *et al.*, 2011), insbes. auch für Polyglutamin-Erkrankungen. Wieso dafür ausgerechnet die Fruchtfliege ausgewählt wurde, hat viele Gründe: Die Tiere brauchen wenig Platz und kaum Futter und sind daher in der Unterhaltung sehr günstig. Hinzu kommen die sehr kurzen Reproduktions- und Entwicklungszyklen. Es dauert gerade einmal zwei Wochen, bis sich aus dem Ei eine adulte Fliege entwickelt hat (Review Ambegaokar *et al.*, 2010). Aufgrund der Tatsache, dass *Drosophila* nur 12.000 Gene, welche auf lediglich vier Chromosomen verteilt sind, besitzt, ist sie sehr leicht genetisch manipulierbar und inzwischen sind Dutzende unterschiedlicher transgener *Drosophila*-Linien verfügbar. Im Laufe der Evolution bis zum Menschen sind sehr viele Mechanismen konserviert worden, sodass sich fundamentale Prozesse wie die Regulation der Genexpression, synaptische Transmission, Zelltod und viele zelluläre Signalwege wie z. B. Wnt und Ras/ERK bei Mensch und *Drosophila* gleich abspielen (Review Ambegaokar *et al.*, 2010).

Das erste *Drosophila*-Modell zur Erforschung neurodegenerativer Krankheiten wurde 1998 für die polyQ-Krankheit SCA3 generiert (Warrick *et al.*, 1998, aus Review Marsh und Thompson, 2006), gefolgt von einem Huntington-Modell im selben Jahr (Jackson *et al.*, 1998, aus Review Marsh und Thompson, 2006) und einem SBMA-Modell vier Jahre später (Takeyama *et al.*, 2002). Dabei wurden bislang vor allem Fliegenlinien verwendet, welche den nativen bzw. den mutierten Androgenrezeptor entweder im Auge oder im gesamten zentralen Nervensystem exprimierten (Chan *et al.*, 2002, Takeyama *et al.*, 2002, Furutani *et al.*, 2005, Funderburk *et al.*, 2008, Murata *et al.*, 2008, Suzuki *et al.*, 2009, Nedelsky *et al.*, 2010, Palazzolo *et al.*, 2010).

Um ein SBMA-spezifisches *Drosophila*-Modell zu generieren, welches es erlaubte, den Wildtyp- und polyQ-erweiterten Androgenrezeptor ausschließlich in Motorneuronen zu exprimieren, wurde vom GAL4-UAS-System Gebrauch gemacht (Brand und Perrimon, 1993). Mithilfe der Treiberlinie OK371-GAL4 (eine großzügige Gabe von Prof. Dr. Christoph Schuster, Heidelberg) wurden die zu exprimierenden UAS-AR-Konstrukte ausschließlich in den Motorneuronen der Fruchtfliegen exprimiert. Da gesunde Individuen am häufigsten einen polyQ-Trakt mit 18-25 polyQ aufweisen (McLean *et al.*, 1996), wurde ein AR-Konstrukt mit 22 polyQ als Repräsentant für den Wildtyp-Androgenrezeptor gewählt (ARQ22). Bei SBMA-Patienten hingegen ist der polyQ-Trakt pathologisch erweitert und umfasst 40 bis mehr als 60 polyQ (La Spada *et al.*, 1991), sodass als Auslöser des SBMA-Phänotyps ein von einem SBMA-Patienten gewonnener AR mit 65 Glutaminreste (ARQ65) in die UAS-Effektorlinie eingebracht wurde. ARQ22- und AR65-exprimierende *Drosophila* wurden kurz nach dem Schlüpfen auf Futter großgezogen, welches entweder nur die Trägersubstanz (Ethanol) oder den AR-Liganden Dihydrotestosteron (DHT) enthielt.

Die Expression der Androgenrezeptor-Konstrukte wurde anhand einer Western Blot Analyse überprüft, welche aus Proteinlysaten, die aus den Köpfen 1-2 Tage alter adulter AR-transgener *Drosophila* hergestellt wurden, durchgeführt wurde (Abb. 3.1). Die Detektion des Androgenrezeptors erfolgte mittels eines AR-spezifischen Antikörpers. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein α -Tubulin. In Relation zu diesem war die Expression des ARQ22 und ARQ65 in den AR-transgenen *Drosophila* nahezu gleich (Abb. 3.1).

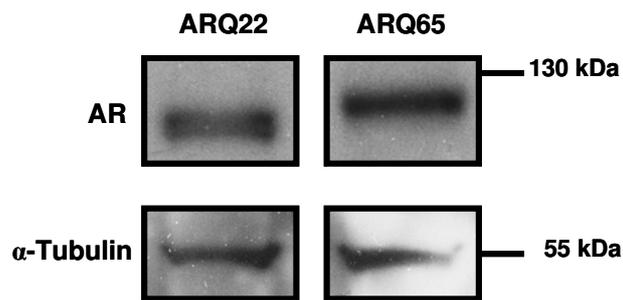


Abb. 3.1 Western Blot Analyse mit Proteinlysaten aus AR-transgenen *Drosophila*

Aus jeweils 100 Köpfen 1-2 Tage adulter AR-transgener Fliegen, welche aus der Kreuzung männlicher UAS-AR-Fliegen (ARQ22, AR65) und Weibchen der Motorneuron-spezifischen Treiberlinie OK371-GAL4 hervorgingen und auf DHT-beinhaltendem Futter großgezogen worden waren, wurden Proteinlysate hergestellt und jeweils 60 µg Gesamtprotein auf einem 10 %-igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Androgenrezeptor wurde anhand des monoklonalen AR441-Antikörpers nachgewiesen, α -Tubulin wurde anhand eines monoklonalen α -Tubulin-Antikörpers detektiert und diente als Ladekontrolle.

3.1.1 Langzeit-Überlebensstudien an AR-transgenen *Drosophila*

Spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA) ist eine sog. *late onset*-Krankheit. Das bedeutet, dass die Symptome erst nach einer gewissen Zeit in Erscheinung treten, beim Menschen zwischen dem dreißigsten und fünfzigsten Lebensjahr. Dies äußert sich vor allem in motorischen Defiziten (Kennedy *et al.*, 1968, Fischbeck, 1997, Atsuta *et al.*, 2006) sowie im vorzeitigen Sterben der Patienten (Banno *et al.*, 2009b).

Um zu untersuchen, ob auch im *Drosophila*-Modell durch die Expression von ARQ22 bzw. ARQ65 ein *late onset* Phänotyp hervorgerufen werden konnte, wurden AR-transgene F1-Fliegenlarven kurz nach dem Schlüpfen aus dem Ei bis zum Imago auf Kontroll- oder DHT-beinhaltendem Futter großgezogen. Spätestens einen Tag nach dem Schlüpfen aus der Puppe wurden die Imagines gesammelt und jeweils 50 in ein neues Gefäß umgesetzt, welchem ebenfalls Ethanol oder DHT beigemischt wurde. Zur Ermittlung Geschlechtsspezifischer Effekte wurden die Fliegen nach Männchen und Weibchen sortiert. Die Anzahl toter Fliegen wurde täglich erfasst und die Überlebensrate über den Zeitraum

von 45 Tagen prozentual errechnet. Zur besseren Übersicht sind jeweils die Werte jedes dritten Tages dargestellt (Abb. 3.2).

Die Langzeit-Überlebensstudie ergab, dass es bei den AR-transgenen *Drosophila* Weibchen nach 45 Tagen einen signifikanten Unterschied nach DHT-Behandlung gab. Anders als zu erwarten gewesen wäre, war jedoch nicht die Anzahl ARQ65-exprimierender *Drosophila* reduziert, sondern die Anzahl derjenigen Fliegen, welche den Wildtyp-Androgenrezeptor exprimierten. Bei den Männchen zeichnete sich ein ähnliches Ergebnis ab. Auch hier überlebten ARQ65-exprimierende *Drosophila* in Anwesenheit von DHT am längsten, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied zu ARQ22-exprimierenden Fliegen. Insgesamt jedoch nahm die Überlebensrate der Männchen schneller ab als die Überlebensrate der Weibchen, was darauf zurückgeführt werden konnte, dass Weibchen generell etwas stressresistenter sind als Männchen (Service *et al.*, 1985).

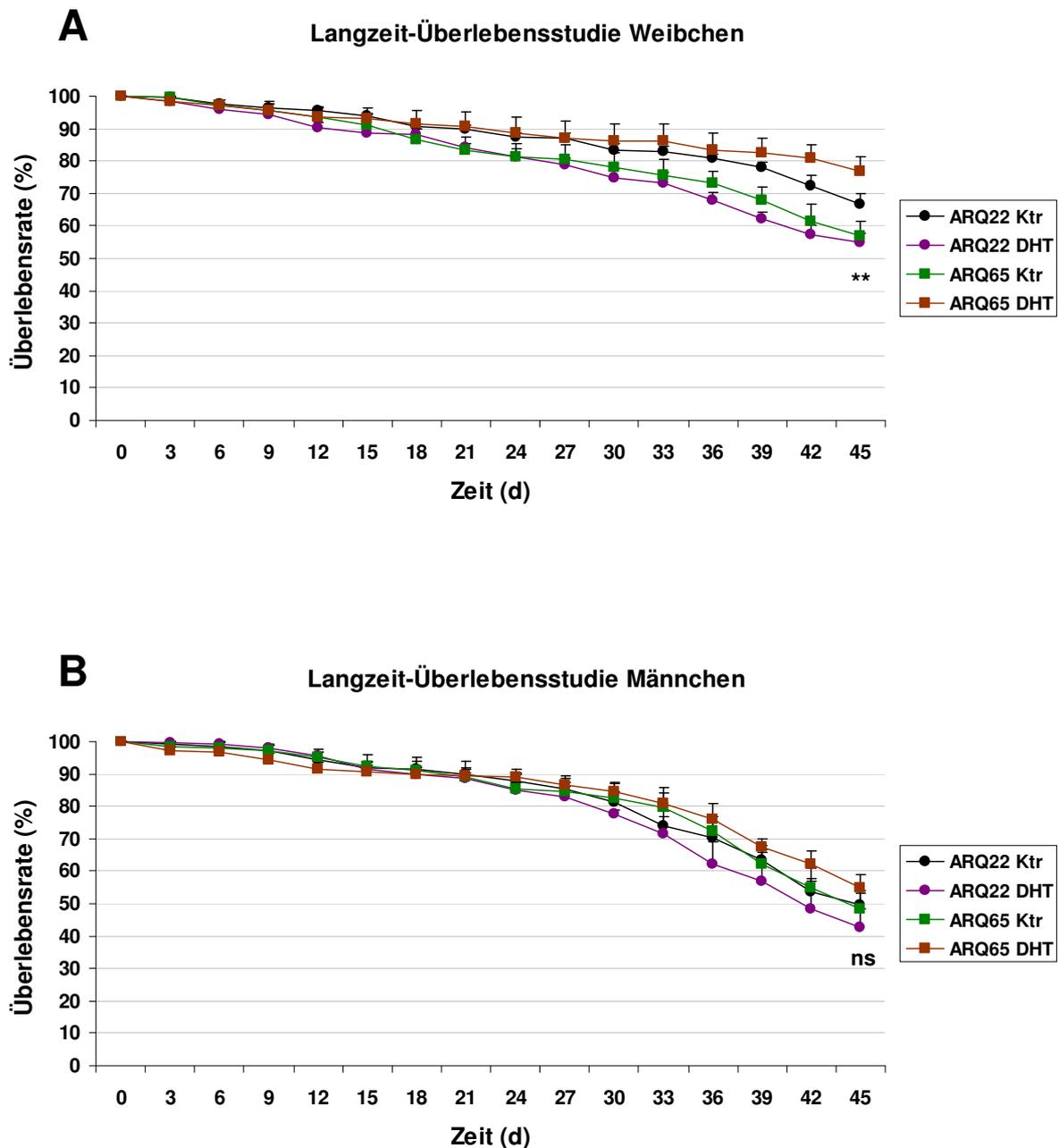


Abb. 3.2 Langzeit-Überlebensstudie weiblicher und männlicher AR-transgener ARQ22- und ARQ65-exprimierender *Drosophila*

Weibchen der OK371-GAL4-Treiberlinie und Männchen der UAS-ARQ22- und UAS-ARQ65-Effektorlinien wurden auf Apfelsaft-Agarplatten gekreuzt und Larven der F1-Generation kurz nach dem Schlüpfen aus dem Ei auf Futter überführt, welches DHT enthielt bzw. nicht enthielt (Ktr). Dort verblieben die Larven bis zur Metamorphose. Nach dem Schlüpfen aus der Puppe wurden pro Geschlecht (A: Weibchen, B: Männchen) und pro Behandlung jeweils 50 adulte Fliegen auf neue Futtergefäße überführt, welche alle 3-4 Tage durch neue ersetzt wurden. Die Anzahl toter Fliegen wurde täglich erfasst und daraus die Langzeit-Überlebensrate über einen Zeitraum von 45 Tagen ermittelt. Angegeben sind die errechneten Werte für jeden dritten Tag. n=4, Zweiseitiger T-Test Typ 2. ** p<0,01, ns: nicht signifikant. SEM.

Die Expression des Ziel-Gens, hier: des Androgenrezeptors, wurde für die OK371-Gal4-Treiberlinie nur bis zum Erreichen des Imagos beschrieben (Mahr und Aberle, 2005) und konnte in den Proteinlysaten aus Köpfen 1-2 Tage alter adulter Fliegen noch nachgewiesen werden, jedoch war es möglich, dass die Expression in den darauffolgenden Tagen nach und nach abnahm.

3.1.2 Kurzzeit-Überlebensstudien und Lokomotionsstudien an AR-transgenen *Drosophila*

Da die Langzeit-Überlebensstudien keinen SBMA-Phänotyp abzeichneten und sich daher für weiter Untersuchungen als nicht geeignet erwiesen, wurde untersucht, ob die Expression verschiedener Androgenrezeptor-Konstrukte in Abhängigkeit von Androgen zu Defekten in der frühen Entwicklung der AR-transgenen Fliegen führen würde. Neben den bereits verwendeten ARQ22- und ARQ65-exprimierenden Fliegenlinien wurden zwei weitere herangezogen: Eine Effektorlinie, welche ein AR-Konstrukt mit einem polyQ-Trakt, welcher künstlich auf ein einziges Glutamin verkürzt worden war (ARQ1), exprimierte, sowie eine Effektorlinie, welcher den Wildtyp-AR mit 22 Glutaminresten mit zwei Aminosäure-Mutationen an den Phosphorylierungs-Stellen Serin 424 und Serin 514, indem die beiden Serinreste durch Alanin ersetzt worden waren (ARQ22dm), exprimierte; vorangegangene Studien zeigten, dass diese Doppelmutation bereits ausreichend war, um den Wildtyp-Androgenrezeptor in einen toxischen zu konvertieren und Neurodegeneration auszulösen, wenn ARQ22dm im Auge oder panneuronal exprimiert wurde (Funderburk *et al.*, 2008). Zur Kontrolle wurde die OK371-GAL4-Treiberlinie mit Oregon-R-S, einem *Drosophila* Wildtyp-Stamm, gekreuzt (Stock Nummer 4269, Bloomington *Drosophila* Stock Center, Universität Indiana, USA; eine großzügige Gabe von Prof. Dr. Michael Pankratz). Die Western Blot Analyse zeigte, dass *Drosophila* keinen endogenen Androgenrezeptor (Abb. 3.3 A), jedoch AR-transgene Fruchtfliegen jeweils ARQ1 und ARQ22dm exprimierten (ABB. 3.3 B).

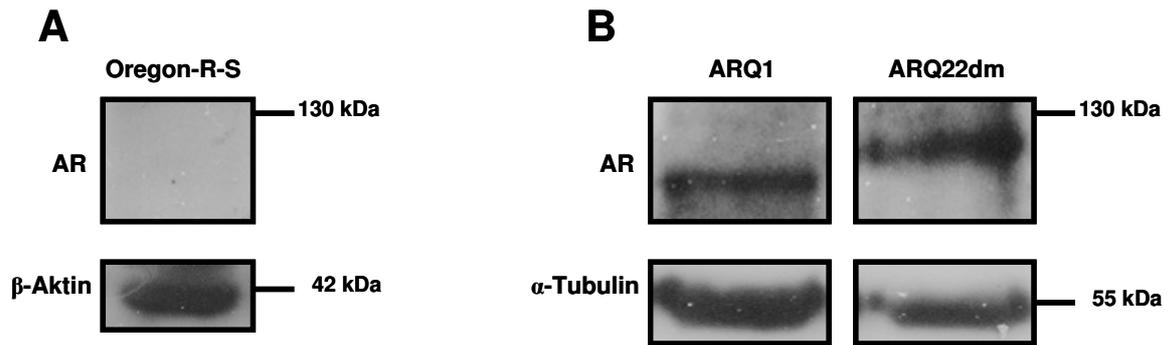


Abb. 3.3 Western Blot Analyse mit Proteinlysaten aus AR-transgenen *Drosophila*

Aus jeweils 100 Köpfen 1-2 Tage adulter AR-transgener Fliegen, welche aus der Kreuzung männlicher Oregon-R-S (A) bzw. männlicher UAS-AR-Fliegen (ARQ1, ARQ22dm) (B) und Weibchen der Motorneuron-spezifischen Treiberlinie OK371-GAL4 hervorgingen und auf DHT-beinhaltendem Futter großgezogen worden waren, wurden Proteinlysate hergestellt und jeweils 60 μ g Gesamtprotein auf einem 10 %-igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Androgenrezeptor wurde anhand des monoklonalen AR 441-Antikörpers nachgewiesen, die Detektion von β -Aktin (A) und α -Tubulin (B) anhand monoklonaler β -Aktin- und α -Tubulin-Antikörper diente als Ladekontrolle.

Die Auswirkungen auf das Verhalten AR-transgener Fliegen, welche die Expression der vier unterschiedlichen AR-Konstrukte (ARQ1, ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) mit sich bringen würde, wurden anhand von Kurzzeit-Überlebens- und Lokomotionsstudien untersucht. Zur Analyse des Lokomotionsverhaltens wurde die Anzahl der Larven, welche an der Innenseite der Futtergefäßwand hoch gewandert waren, um sich dort zu verpuppen, errechnet (Abb. 3.4), um daraus einen Rückschluss auf die Lokomotionsfähigkeit zu ziehen.

Es stellte sich heraus, dass in dieser Versuchsanordnung in diesen Studien bereits ein deutlicher SBMA-Phänotyp zu erkennen war, welcher auf die Expression unterschiedlicher AR-Konstrukte zurückgeführt werden konnte: Während sowohl die Wildtyp-Fliegen als auch die verpuppten ARQ1- und ARQ22-exprimierenden Fliegenlarven unabhängig vom verabreichten Futter zu 80-90 % an der Gefäßwand zu finden waren und somit kein beeinträchtigt Lokomotionsverhalten offenbarten, war nach DHT-Behandlung die Anzahl derjenigen Larven, welche ARQ65 bzw. ARQ22dm

exprimierten, statistisch signifikant reduziert, wobei dieser Effekt bei letztgenannten Larven am deutlichsten ausgeprägt war (Abb. 3.4).

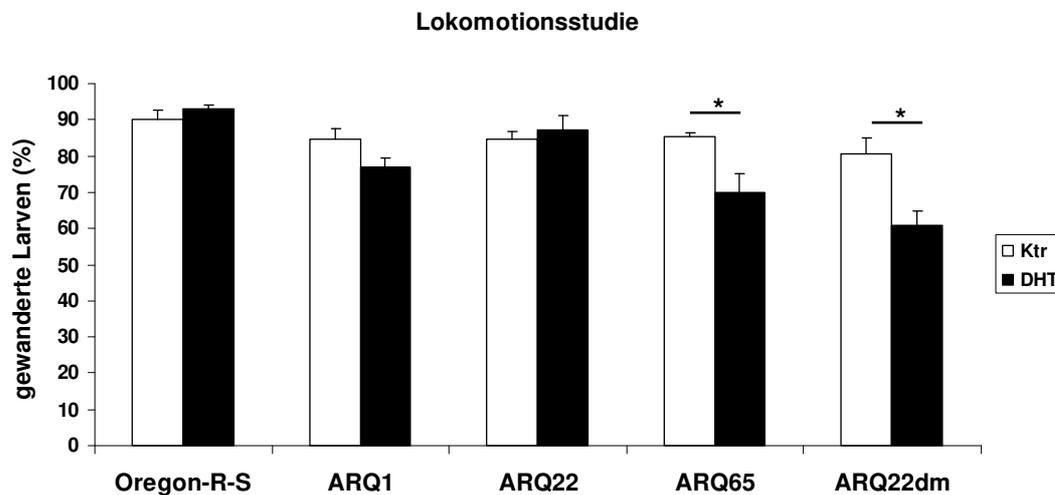


Abb. 3.4 Lokomotionsstudie AR-transgener *Drosophila*-Larven nach DHT-Behandlung

Jeweils 50 frisch geschlüpfte Larven der F1-Generation, welche aus der Kreuzung männlicher Oregon-R-S bzw. männlicher UAS-AR-Fliegen (ARQ1, ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) und Weibchen der Motorneuron-spezifischen Treiberlinie OK371-GAL4 hervorgingen, wurden im ersten Larvenstadium auf Futter umgesetzt, welches Ethanol (Ktr) bzw. DHT enthielt. Die lokomotorischen Fähigkeiten wurden ermittelt, indem die Anzahl derjenigen Larven, welche das Futter im dritten Larvenstadium verlassen hatten, um sich an der Wand des Futtergefäßes zu verpuppen, prozentual errechnet wurde. n=4, zweiseitiger T-Test Typ 2, * p<0,05, SEM.

Mit der Lokomotionsstudie einhergehend, wurde im selben Versuchsansatz eine sog. Kurzzeit-Überlebensstudie durchgeführt: Nachdem die Imagines aus den Puppen geschlüpft waren, wurden sie gesammelt und die Anzahl adulter Fliegen prozentual ermittelt (Abb. 3.5). Das Resultat hierbei war vergleichbar mit jenem der Lokomotionsstudie: AR-transgene *Drosophila*, welche ARQ1 oder ARQ22 exprimierten, wiesen nach DHT-Behandlung keine verminderte Überlebensrate auf, wohingegen nach Hormonbehandlung signifikant weniger ARQ65- und ARQ22dm-exprimierende Fliegen schlüpften. Es war anzunehmen, dass das Überleben hierbei von der Lokomotionsfähigkeit der Tiere abhing. Die Larven gruben sich direkt nach der

Überführung in das Futter hinein, wo sie verbleiben, bis sie zum Verpuppen ins Trockene wandern. Lokomotorische Defekte könnten dazu geführt haben, dass die Larven nicht mehr aus dem Futter heraus kriechen konnten und darin starben, sodass die verminderte Überlebensrate vermutlich einen sekundären SBMA-Phänotyp darstellte und daher für weitere Untersuchungen an *Drosophila* insbes. Lokomotionsstudien durchgeführt wurden.

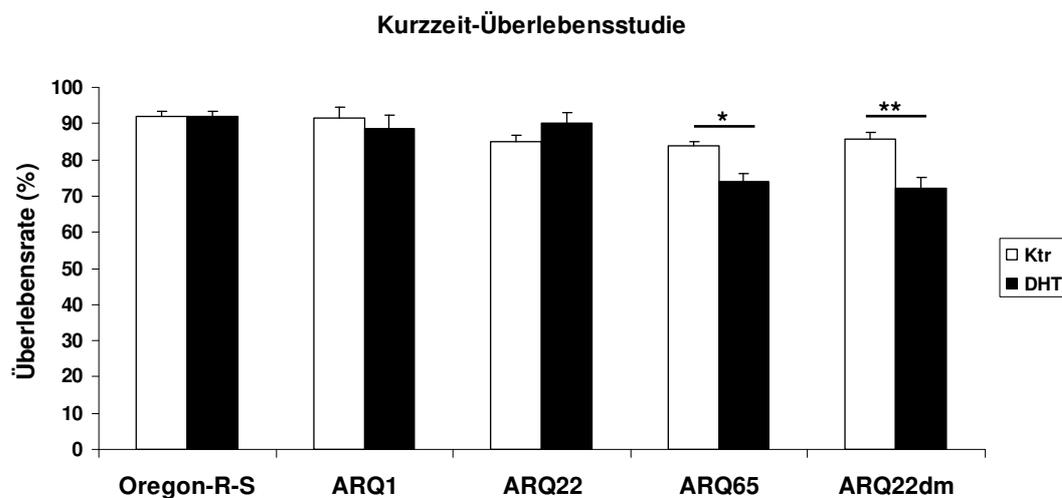


Abb. 3.5 Kurzzeit-Überlebensstudie AR-transgener *Drosophila* nach DHT-Behandlung

Jeweils 50 frisch geschlüpfte Larven der F1-Generation, welche aus der Kreuzung männlicher Oregon-R-S bzw. männlicher UAS-AR-Fliegen (ARQ1, ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) und Weibchen der Motorneuron-spezifischen Treiberlinie OK371-GAL4 hervorgingen, wurden im ersten Larvenstadium auf Futter umgesetzt, welches Ethanol (Ktr) bzw. DHT enthielt. Einhergehend mit der Lokomotionsstudie wurde untersucht, inwieweit sich die Expression der verschiedenen AR-Konstrukte und gleichzeitige Behandlung mit DHT auf das Überleben der Larven nach der Metamorphose auswirken würde. Dazu wurde die Anzahl an Imagines, die aus der Puppe geschlüpft waren, gezählt und die Überlebensrate prozentual ermittelt. n=4, zweiseitiger T-Test Typ 2, * p<0,05, ** p<0,01, SEM.

3.1.3 Untersuchungen des Effekts von Melatonin auf den DHT-abhängigen Phänotyp AR-transgener *Drosophila*

Für SBMA gibt es bislang noch keine Therapie. Aus diesem Grunde wird seit jeher nach einer Substanz gesucht, welche die Symptome, die mit SBMA einhergehen, abzuschwächen vermag. Einige Substanzen wurden bislang in SBMA *Drosophila*-Modellen getestet, darunter auch Melatonin. Dieses wurde AR-transgenen Fruchtfliegen, welche verschiedene Androgenrezeptor-Konstrukte u. a. panneuronal exprimierten, verabreicht und konnte dabei den DHT-induzierten Phänotyp bezüglich lokomotorischer Fähigkeiten signifikant verbessern (Funderburk *et al.*, 2008).

Zur Überprüfung der Effekte von Melatonin auf den AR, wenn dieser in den Motorneuronen AR-transgener *Drosophila* exprimiert wurde, wurden Fliegen der OK371-GAL4-Treiberlinie und der UAS-AR-Effektorlinien (ARQ1, ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) verkreuzt. Die Lokomotionsfähigkeit dieser Fliegen nach Kontroll- bzw. Hormonfutter wurde überprüft und dabei festgehalten, dass ARQ1- und ARQ22-exprimierende Fliegen keine Unterschiede bezüglich des verabreichten Futters erkennen ließen. Der bereits in Abb. 3.4 und 3.5 beschriebene DHT-abhängige negative Effekt die Lokomotionsfähigkeit ARQ65- und ARQ22dm-exprimierender Fliegen betreffend, konnte durch gleichzeitige Verabreichung von Melatonin wieder auf Kontrollniveau gebracht und damit vollständig gehemmt werden (Abb. 3.6 A).

Auch das Überleben dieser *Drosophila* konnte durch die Anwesenheit von Melatonin bei ARQ65-exprimierenden Fruchtfliegen signifikant verbessert und ein vollständiger *Rescue*-Effekt erreicht werden, welcher in diesem Ausmaß nicht zu verzeichnen war, wenn die Larven ARQ22dm exprimierten (Abb. 3.6 B). Dies stand im Gegensatz zu den bereits durchgeführten Studien von Funderburk *et al.* (2008), wobei ARQ22dm in *Drosophila* panneuronal exprimiert wurde und die Anwesenheit von Melatonin die DHT-abhängige Überlebensrate dieser Fliegen sehr wohl signifikant verbessern konnte. Dennoch zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Melatonin in ARQ65- und ARQ22dm-exprimierenden Fliegen die Lokomotionsdefekte und somit den primären SBMA-Phänotyp, welcher durch DHT ausgelöst wurde, vollständig kompensierte.

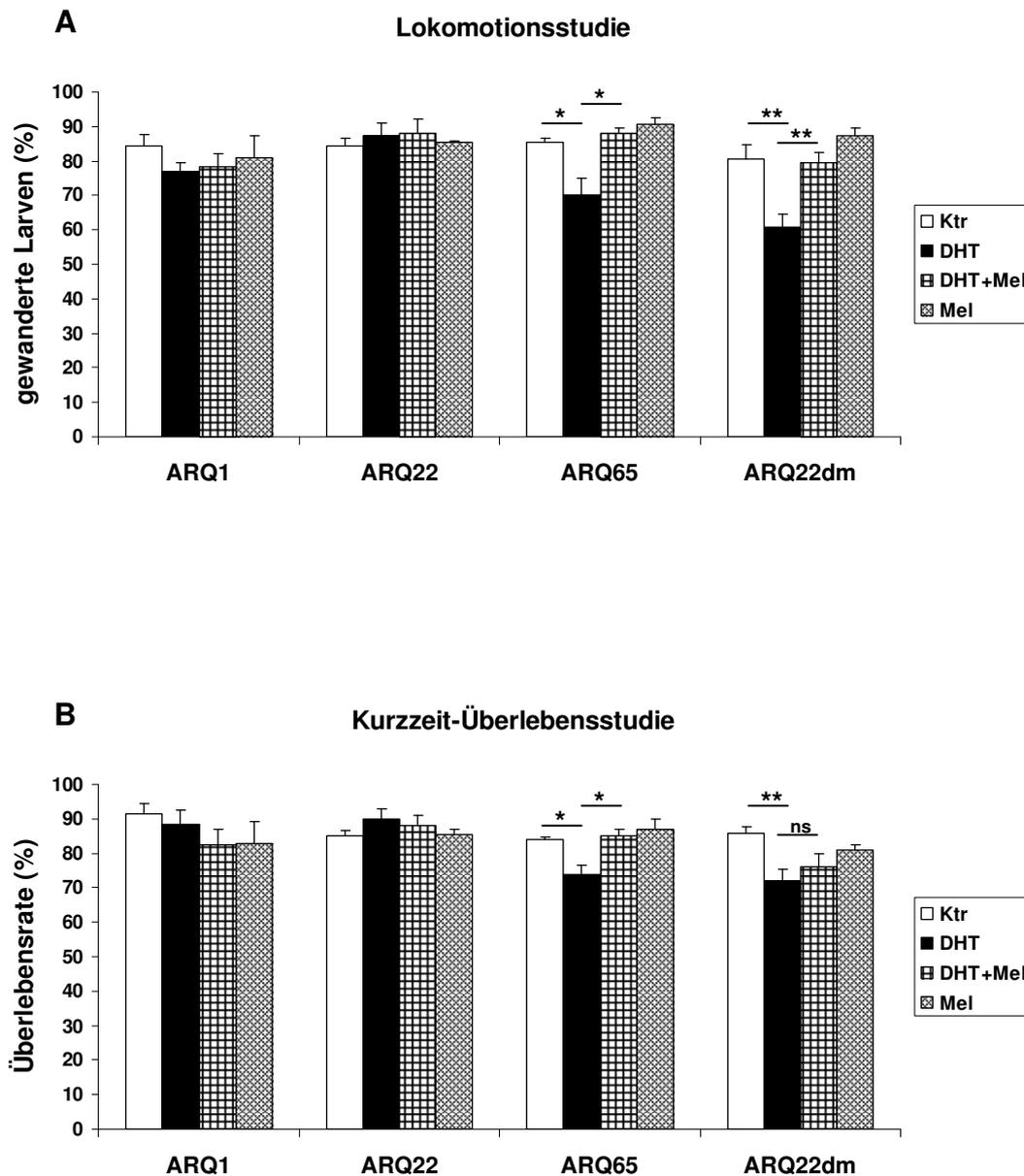


Abb. 3.6 Effekte von Melatonin auf die Lokomotionsfähigkeit und die Überlebensrate AR-transgener *Drosophila*

Jeweils 50 frisch geschlüpfte *Drosophila* Larven der F1-Generation, welche aus der Kreuzung männlicher UAS-AR-Fliegen (ARQ1, ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) und Weibchen der Motorneuron-spezifischen Treiberlinie OK371-GAL4 hervorgingen, wurden im ersten Larvenstadium auf Futter umgesetzt, welches Ethanol (Ktr), DHT und/oder Melatonin enthielt. Die lokomotorischen Fähigkeiten wurden ermittelt, indem die Anzahl derjenigen Larven, welche das Futter im dritten Larvenstadium verlassen hatten, um sich an der Wand des Futtergefäßes zu verpuppen, prozentual errechnet wurde (A). Im selben Versuchsansatz wurde des Weiteren die prozentuale Überlebensrate dieser Fliegen nach der Metamorphose zur adulten Fliege in einer Kurzzeit-Überlebensstudie (B) ermittelt. n=3-4, zweiseitiger T-Test Typ 2, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ns: nicht signifikant, SEM.

3.1.4 Die Wirkungen von Melatonin-Analoga auf das Lokomotionsverhalten AR-transgener *Drosophila*

Zur Verifizierung, dass die positiven Wirkungen von Melatonin auf den DHT-induzierten Phänotyp auch wirklich auf Melatonin zurückzuführen waren und es sich dabei nicht um zufällige Effekte handelte, wurden Lokomotionsstudien mit Melatonin-Analoga durchgeführt.

Melatonin-Agonisten sind künstliche, sehr potente chemische Substanzen, für die gezeigt wurde, dass sie in geringer Konzentration ähnliche Effekte wie Melatonin hervorriefen. Diese Substanzen wurden u. a. als Melatonin-Alternativen entwickelt, da die Halbwertszeit von physiologisch synthetisiertem Melatonin im Organismus mit weniger als 30 Minuten recht gering ist (Pandi-Perumal *et al.*, 2009). Die beiden Melatonin-Agonisten 2-Phenylmelatonin (2-PM) (Spadoni *et al.*, 1993, Nonno *et al.*, 1998, 1999, Santagostino-Barbone *et al.*, 2000) und 8-methoxy-2-propionamidotetralin (8-M-PDOT; Dubocovich, 1995, Dubocovich *et al.*, 1997, Browning *et al.*, 2000) wurden ausgewählt und in sehr geringeren Konzentration (10^{-10} M) getestet. In dieser Studie wurde zum Vergleich Melatonin in derselben Konzentration (10^{-10} M) verabreicht.

Darüber hinaus wurde die Wirkung des Melatonin-Abbauprodukts 6-Hydroxymelatonin (6-HM) in derselben Konzentration wie Melatonin in den bislang durchgeführten Studien getestet. Für 6-HM wurde bereits beschrieben, dass es deutlich schwächere bis keinerlei Melatonin-agonistische Wirkungen vermittelte (Dubocovich, 1995, del Río *et al.*, 2004).

Die Wirkungen dieser Melatonin-Analoga auf ARQ22- und ARQ65-exprimierende Larven wurden untersucht. Es stellte sich in den Lokomotionsstudien heraus, dass Wildtyp-AR-exprimierende Fliegenlarven keinerlei Unterschiede bezüglich des verabreichten Futters zeigten. Sowohl nach DHT-Behandlung als auch nach Behandlung mit den Melatonin-Agonisten bzw. 6-Hydroxymelatonin alleine oder in Kombination mit DHT war das Lokomotionsverhalten stets vergleichbar mit den lokomotorischen Fähigkeiten, welche die *Drosophila* Larven nach Behandlung mit Kontrollfutter offenbarten (Abb. 3.7 und 3.8).

Die Untersuchung transgener ARQ65-Fliegen zeigte erneut, dass die Verabreichung von DHT zu einer signifikanten Reduktion der Bewegungsfähigkeit führte. Bei diesen Fliegen konnten die beiden Melatonin-Agonisten schon in sehr geringer Konzentration den SBMA-Phänotyp hemmen, wenn sie gleichzeitig mit DHT verabreicht wurden, wohingegen Melatonin in derselben Konzentration wie die Melatonin-Agonisten keinen *Rescue*-Effekt ausübte (Abb. 3.7).

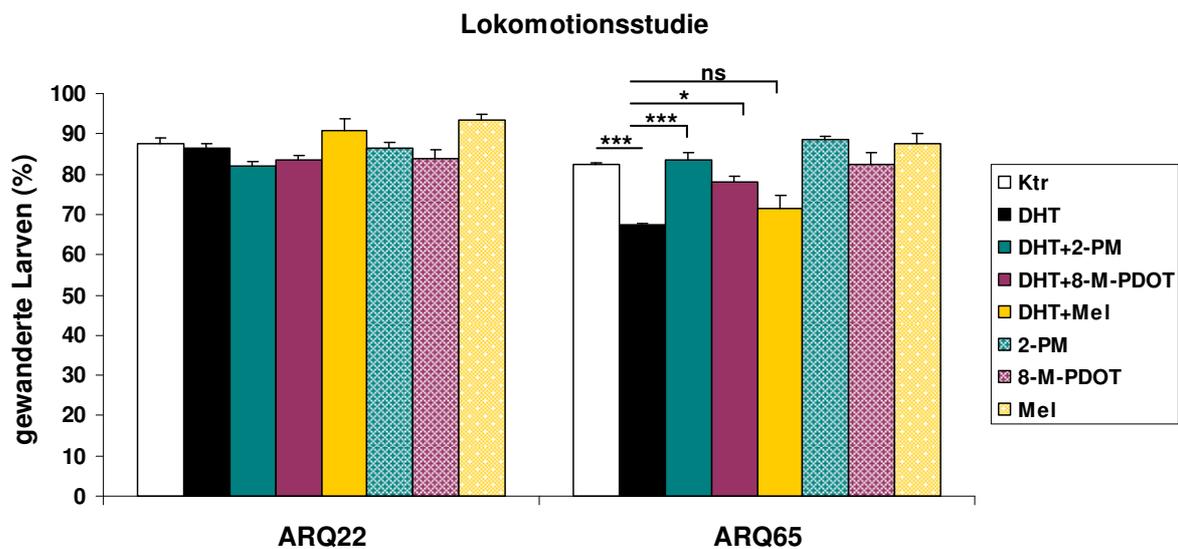


Abb. 3.7 Effekte der Melatonin-Agonisten 2-PM und 8-M-PDOT auf das Lokomotionsverhalten AR-transgener *Drosophila*

Jeweils 50 frisch geschlüpfte Larven der F1-Generation, welche aus der Kreuzung männlicher UAS-AR-Fliegen (ARQ22, ARQ65) und Weibchen der Motorneuron-spezifischen Treiberlinie OK371-GAL4 hervorgingen, wurden im ersten Larvenstadium auf Futter umgesetzt, welches Ethanol (Ktr), DHT und/oder jeweils 10^{-10} M der Substanzen 2-Phenylmelatonin (2-PM) und 8-M-PDOT bzw. 10^{-10} M Melatonin enthielt. Die lokomotorischen Fähigkeiten wurden ermittelt, indem die Anzahl derjenigen Larven, welche das Futter im dritten Larvenstadium verlassen hatten, um sich an der Wand des Futtergefäßes zu verpuppen, prozentual errechnet wurde (A). $n=3$, zweiseitiger T-Test Typ 2, * $p<0,05$, *** $p<0,001$, ns: nicht signifikant, SEM.

Die Anwesenheit des Melatonin-Abbauprodukts 6-Hydroxymelatonin, welches in derselben Konzentration wie Melatonin (vgl. 3.1.3) über das Futter verabreicht wurde, hatte weder in An-, noch in Abwesenheit von DHT einen Effekt auf ARQ22-exprimierende Larven (Abb. 3.8). ARQ65-transgene *Drosophila* hingegen legten signifikante lokomotorische Defizite an den Tag, wenn diesen DHT in Kombination mit 6-HM verabreicht wurde, sodass das Melatonin-Abbauprodukt nicht denselben *Rescue*-Effekt wie Melatonin und die beiden getesteten Melatonin-Agonisten hervorrief.

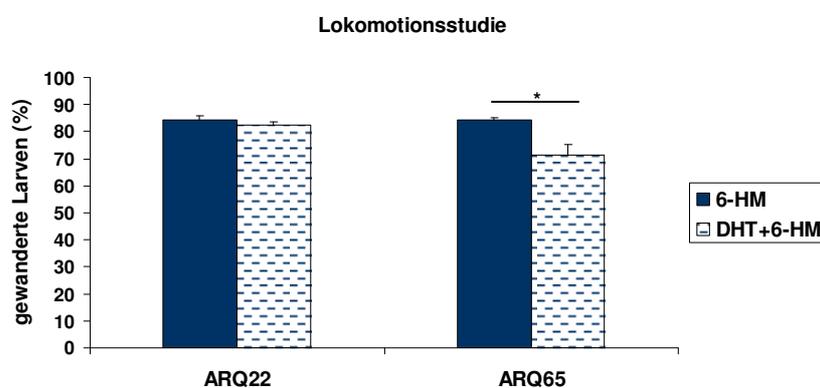


Abb. 3.8 6-HM auf die Lokomotionsfähigkeit AR-transgener *Drosophila*

Jeweils 50 frisch geschlüpfte Larven der F1-Generation, welche aus der Kreuzung männlicher UAS-AR-Fliegen (ARQ22, ARQ65) und Weibchen der Motorneuron-spezifischen Treiberlinie OK371-GAL4 hervorgingen, wurden im ersten Larvalstadium auf Futter umgesetzt, welches 6-Hydroxymelatonin (6-HM) und/oder DHT enthielt. Die Lokomotionsfähigkeiten wurden ermittelt, indem die Anzahl derjenigen Larven, welche das Futter im dritten Larvenstadium verlassen hatten, um sich an der Wand des Futtergefäßes zu verpuppen, prozentual errechnet wurde (A). n=4, zweiseitiger T-Test Typ 2, * p<0,05, SEM.

3.1.5 Morphologische Untersuchungen der neuromuskulären Verbindungen AR-transgener *Drosophila*

Der Ort, an welchem die Vermittlung des Lokomotionssignals an den Muskel weitergeleitet wird, ist die neuromuskuläre Verbindung, an welcher zugleich aufgrund ihrer Plastizität kurz- oder längerfristige Änderungen im zentralen Nervensystem von *Drosophila* abgelesen werden können (Sarathi und Elefant, 2011). Daher wird die neuromuskuläre Verbindung häufig als eine Art Ablesesystem bei der Erforschung neurodegenerativer Störungen im *Drosophila*-System herangezogen (Dawson-Scully *et al.*, 2007, Sinadinos *et al.*, 2009, Rossetto *et al.*, 2011, Sarathi und Elefant, 2011). Dabei wurde bislang gezeigt, dass sowohl die Anzahl synaptischer Endbläschen stark vom normalen Phänotyp abwich (Roos *et al.*, 2000, McCabe *et al.*, 2004, Nedelsky *et al.*, 2008), als auch Veränderungen in der Länge und Anzahl synaptischer Verzweigungen auftraten (Angaut-Petit *et al.*, 1998, Pan *et al.*, 2004, Gatto und Broadie 2008).

Um genauer zu untersuchen, welche Defekte im Detail im hierbei verwendeten *Drosophila*-Modell zu den gefundenen Lokomotionsstörungen und evtl. zu damit einhergehenden Überlebensdefiziten geführt haben könnten, wurde die neuromuskuläre Morphologie der AR-transgenen Tiere im letzten Larvenstadium kurz vor dem Verpuppen untersucht, welche mit DHT- und/oder Melatonin-Futter bzw. Kontrollfutter behandelt worden waren. Dazu wurden die Muskeln, die der Innenseite der Kutikula auflagen, freipräpariert, fixiert und neuronale Strukturen mithilfe eines Fluoreszenz-markierten Meerrettichperoxidase-Antikörpers (Jan und Jan, 1982) markiert und anschließend anhand eines Fluoreszenz-Mikroskops analysiert.

Das leicht zugängliche Muskelpaar 6/7, welches das vierte Abdominalsegment innerviert, wird typischerweise für morphologische Studien in *Drosophila* herangezogen (McCabe *et al.*, 2004, Dawson-Scully *et al.*, 2007, Schwenkert *et al.*, 2008, Sarathi und Elefant, 2011). Es wird von zwei physiologisch unterschiedlichen Motorneuronen innerviert (Jan und Jan, 1976, Atwood *et al.*, 1993, Hoang und Chiba, 2001): Von dem Motorneuron MN6/7-Ib, welches 3-6 μm große Ib-Boutons bildet und von dem Motorneuron MNSNb/d-Is, aus welchem Is-Boutons hervorgehen, die 2-4 μm im Durchmesser aufweisen (Hoang und Chiba, 2001).

Das Muskelpaar 6/7 im vierten Abdominalsegment wurde in dieser Studie auf vier unterschiedliche Parameter untersucht: (i) Die Länge dieses Muskelpaares, (ii) die

Gesamtzahl synaptischer Endbläschen (Boutons), in welchen die Neurotransmitter lagern (Freeman *et al.*, 2011), wobei zwischen Ib- und Is-Boutons nicht unterschieden wurde, da diese in der Größe überlappten und eine Zuordnung mit bloßem Auge kaum durchführbar war (Angaut-Petit *et al.*, 1998), (iii) die Länge der beiden Motorneuronen, welche dieses Muskelpaar innervierten, sowie (iv) die Anzahl der Verzweigungen dieser Neuronen (definiert durch mindestens drei beinhaltende Boutons) (Abb. 3.9).

Die morphologische Untersuchung ergab, dass keine Unterschiede bei der Länge des Muskelpaares 6/7 und der Anzahl der Boutons auftraten, unabhängig davon, welches AR-Konstrukt die Larven exprimierten und gleichzeitig unabhängig davon, welches Futter den Larven verabreicht worden war (Abb. 3.10 A, B). Die Länge der beiden innervierenden Neuronen war bei ARQ1- und ARQ22-exprimierenden Larven signifikant erhöht, wenn diese sich in Anwesenheit von DHT entwickelten und könnte auf die anabole Wirkung, welche Androgenen allgemein im neuromuskulären System zugeschrieben wird (Brooks *et al.*, 1998, Watson *et al.*, 2001), zurückzuführen gewesen sein; bei ARQ22dm-exprimierenden Fruchtfliegen ergab sich nach DHT + Melatonin-Behandlung ebenfalls eine signifikante Erhöhung, jedoch war hierbei die Länge des Neurons in Abwesenheit von Hormon im Vergleich zu Larven, welche die anderen drei AR-Konstrukte exprimierten, am geringsten. ARQ65-exprimierende Larven legten keine statistisch relevanten Unterschiede an den Tag; hierbei war die Länge unabhängig vom verabreichten Futter nahezu konstant.

Eine Analyse der Anzahl der Verzweigungen der Motorneuronen ergab jedoch ein anderes Ergebnis. Die Anzahl der Verzweigungen war DHT-abhängig signifikant reduziert, wenn die Larven die beiden pathologischen Konstrukte ARQ65 und ARQ22dm exprimierten (Abb. 3.10 D, Abb. 3.10 B, D), wobei letztgenannte einen weniger starken Phänotyp aufwies. Bei der Expression dieser beiden AR-Konstrukte führte die gleichzeitige Verabreichung von Melatonin jeweils zu einem vollständigen *Rescue*-Effekt und konnte die Anzahl neuronaler Verzweigungen nicht nur wieder auf Kontrollniveau bringen, sondern sogar noch darüber hinaus, insbes. bei ARQ65-exprimierenden *Drosophila*, erhöhen.

Bei ARQ22-exprimierenden Larven war eine Reduktion der Anzahl axonaler Verzweigungen nach DHT-Behandlung festzustellen, welche aufgrund der hohen Anzahl an Verzweigungen in Abwesenheit von Hormon statistisch signifikant war.

Somit konnten insbes. die Ergebnisse der Lokomotionsanalysen in *Drosophila* auch auf morphologischer Ebene an jenem Ort, wo die Mobilität des Organismus vermittelt wird, dahingehend spezifiziert werden, dass zum einen die Behandlung mit DHT in Fliegenlarven, welche pathologische AR-Konstrukte exprimierten, zu einer signifikanten Verminderung der Anzahl neuronaler Verzweigungen führte, was ebenfalls durch die simultane Zugabe von Melatonin verhindert wurde.

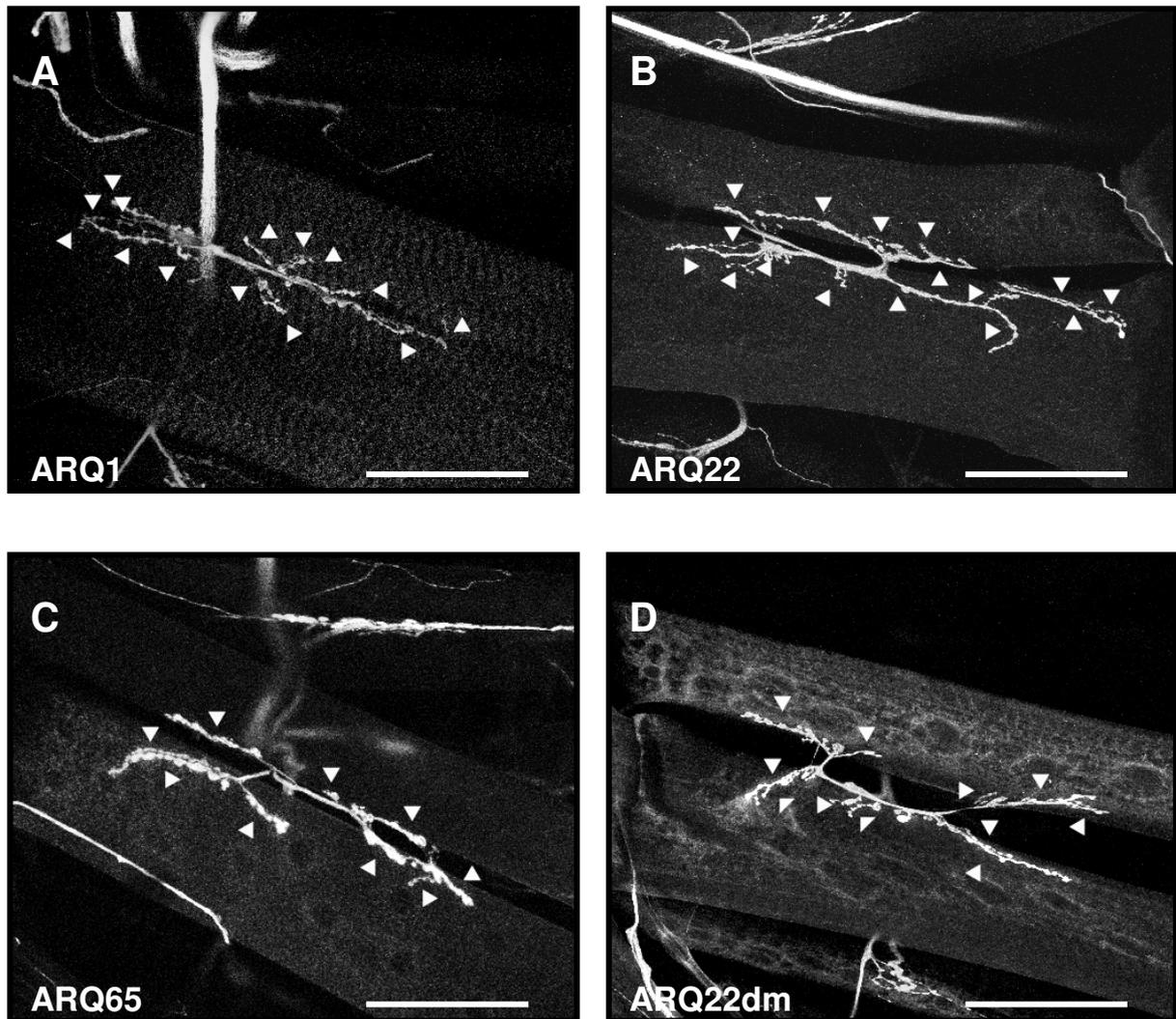


Abb. 3.9 Morphologische Untersuchungen AR-transgener *Drosophila* im dritten Larvenstadium

Weibchen der OK371-GAL4-Treiberlinie und Männchen der UAS-AR-Effektorlinien (ARQ1, ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) wurden auf Apfelsaft-Agarplatten gekreuzt und Larven der F1-Generation kurz nach dem Schlüpfen aus dem Ei auf Kontrollfutter bzw. Hormon-beinhaltendem Futter großgezogen. Die Muskeln, welche der Innenseite der Kutikula auflagen, wurden von umherwandernden Larven des dritten Larvenstadiums (L3) freipräpariert, fixiert und neuronale Strukturen mithilfe eines CyTM5-gekoppelten AffiniPure Ziege-anti-Meerrettichperoxidase-Antikörpers (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, England) gefärbt, um neuronale Strukturen zu markieren (Jan und Jan, 1982). Exemplarisch dargestellt sind hier jeweils präparierte ARQ1-, ARQ22-, ARQ65- und ARQ22dm-exprimierende L3-Larven, welche sich auf DHT- beinhaltendem Futter entwickelten (Analyse in Abb. 3.10). Die beiden Neuronen, welche das Muskelpaar 6/7 des vierten Abdominalsegments innervierten, wurden analysiert. Pfeile stellen jeweils eine neuronale Verzweigung dar, welche per Definition mindestens drei Boutons aufwies. Der Balken gibt jeweils eine Länge von 100 μ m an. Die Bilder wurden an einem konfokalen Zeiss LSM510 Meta Fluoreszenz-Mikroskop mit 100-facher Vergrößerung angefertigt.

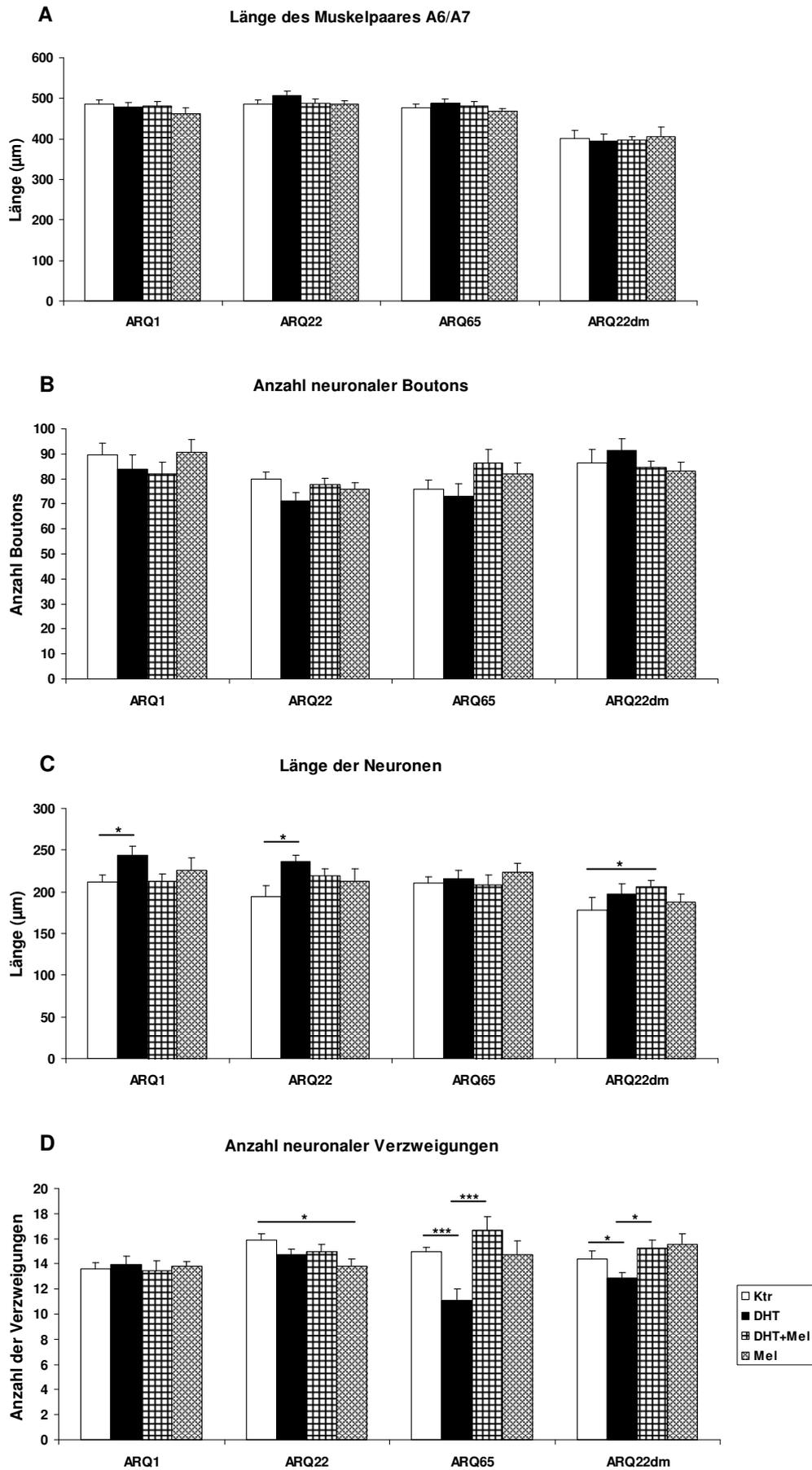


Abb. 3.10 Quantifizierungen der morphologischen Analysen AR-transgener *Drosophila*

Weibchen der OK371-GAL4-Treiberlinie und Männchen der UAS-AR-Effektorlinien (ARQ1, ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) wurden auf Apfelsaft-Agarplatten gekreuzt und Larven der F1-Generation kurz nach dem Schlüpfen aus dem Ei auf Futter überführt, welches Ethanol (Ktr), DHT und/oder Melatonin enthielt. Die Muskeln, welche der Innenseite der Kutikula aufliegen, wurden von umherwandernden L3-Larven freipräpariert, fixiert und neuronale Strukturen mithilfe eines CyTM5-gekoppelten AffiniPure Ziege-anti-Meerrettichperoxidase-Antikörpers (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, England) gefärbt, um neuronale Strukturen zu markieren. Das Muskelpaar 6 und 7 des vierten Abdominalsegments wurde auf folgende Parameter untersucht: Die Gesamtlänge dieses Muskelpaares (A), die Anzahl synaptischer Endbläschen (Boutons) der beiden innervierenden Neuronen (B), die Gesamtlänge dieser Neuronen (C) sowie die Anzahl an Verzweigungen, welche diese Neuronen aufwiesen (D). n=9-15, zweiseitiger T-Test Typ 2, * p<0,05, *** p<0,001, SEM. Analysiert anhand eines Leica DM5000B Fluoreszenz-Mikroskops.

3.2 Expression des Androgenrezeptors in Insektenzellen mithilfe des Baculovirus-Expressionssystems

Im *Drosophila*-System konnte gezeigt werden, dass die Expression der pathologischen AR-Konstrukte ARQ65 und ARQ22dm zu lokomotorischen Defekten führte, welche in Anwesenheit von Melatonin negiert bzw. abgeschwächt werden konnten. Zur Untersuchung, ob diese beiden AR-Konstrukte auch auf zellulärer Ebene Toxizität hervorrufen konnten und ob Melatonin ebenfalls in diesen Prozess intervenieren könnte, wurde vom Baculovirus-Expressionssystem Gebrauch gemacht, welches es ermöglichte, in Sf9 Insektenzellen verschiedene AR-Konstrukte (ARQ22, ARQ65, ARQ22dm) mit sehr hoher Effizienz zu exprimieren (Xie *et al.*, 1992). Das Prinzip dieses Systems basierte auf einem Expressionsplasmid, in welches die zu exprimierenden AR-Konstrukte kloniert wurden. Anschließend wurde dieses durch Transformation in spezielle kompetente *E. coli*-Zellen eingebracht, welche einen „Baculovirus Shuttle-Vektor“ (Bacmid genannt) enthielten. Im Inneren der *E. coli*-Zellen entstand durch Transposition ein rekombinantes Bacmid, aus welchem anschließend die zu exprimierende AR-DNA isoliert und angereichert wurde, sodass ein hochkonzentrierter Titer (Inkolum genannt) aus Baculovirus-Partikeln entstand, welcher daraufhin verwendet werden konnte, um *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Insektenzellen zu infizieren (Bac-to-Bac®, Invitrogen, Karlsruhe; nach King und Possee, 1992, O'Reilly *et al.*, 1992 Luckow *et al.*, 1993; modifiziert nach Juzumiene *et al.*, 2005).

In auf diese Weise bereits durchgeführten Studien wurde u. a. der AR bezüglich seiner Hormon-Bindeeigenschaften (Wong *et al.*, 1993, Beitel *et al.*, 1995) näher charakterisiert, seine Dimerisierungs- und DNA-Binde-Eigenschaften (Liao *et al.*, 1999, Miner *et al.*, 2007) sowie Hormon-induzierte Konformationsänderungen (Wang *et al.*, 1999) und funktionale und strukturelle Eigenschaften (Juzumiene *et al.*, 2005) untersucht und zur Herstellung eines Antikörpers (Liao *et al.*, 1999) verwendet.

3.2.1 Ermittlung der Wachstumsrate AR-exprimierender Sf9 Zellen

Zur Analyse, wie sich die Expression der AR-Konstrukte auf das Wachstum der Sf9 Insektenzellen auswirken würden, wurde die Wachstumsrate der Zellen über den Verlauf von drei Tagen untersucht und mit nicht infizierten Sf9 Zellen verglichen (Abb. 3.11). Dazu wurden Zellen für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt ausgesät und mit Baculovirus-Partikeln zur Expression von ARQ2-, ARQ65 und ARQ22dm infiziert (freundlicherweise von Dr. Tobias Jochum und Rebecca Seeger zur Verfügung gestellt). Die Wachstumsrate wurde mithilfe von Celltiter Blue® ermittelt. Das Prinzip basierte darauf, dass metabolisch aktive Zellen den blauen Redox-Farbstoff Resazurin durch Reduktion irreversibel in den pink- bis rosa-farbenen, fluoreszenten Farbstoff Resorufin umsetzten, dessen Fluoreszenz-Signal gemessen werden konnte, wohingegen tote oder sterbende Zellen kein fluoreszentes Signal erzeugten. Die Wachstumsrate der Zellen wurde aus gemittelten Triplikaten-Messwerten pro Infektionsansatz jeweils in Relation zum bei 0h Infektion ermittelten Messwert erstellt (Abb. 3.11).

Es stellte sich heraus, dass das Wachstum über den Verlauf von drei Tagen sein Maximum an Tag 2 (48h Infektion) erreichte und das Wachstum der Sf9 Zellen am besten verlief, wenn diese nicht oder mit dem Wildtyp-Androgenrezeptor infiziert worden waren. Die Infektion mit ARQ65 und ARQ22dm hingegen führte zu langsameren Wachstumsraten, wobei ARQ22dm-exprimierende Sf9 Insektenzellen am langsamsten wuchsen (Abb. 3.11).

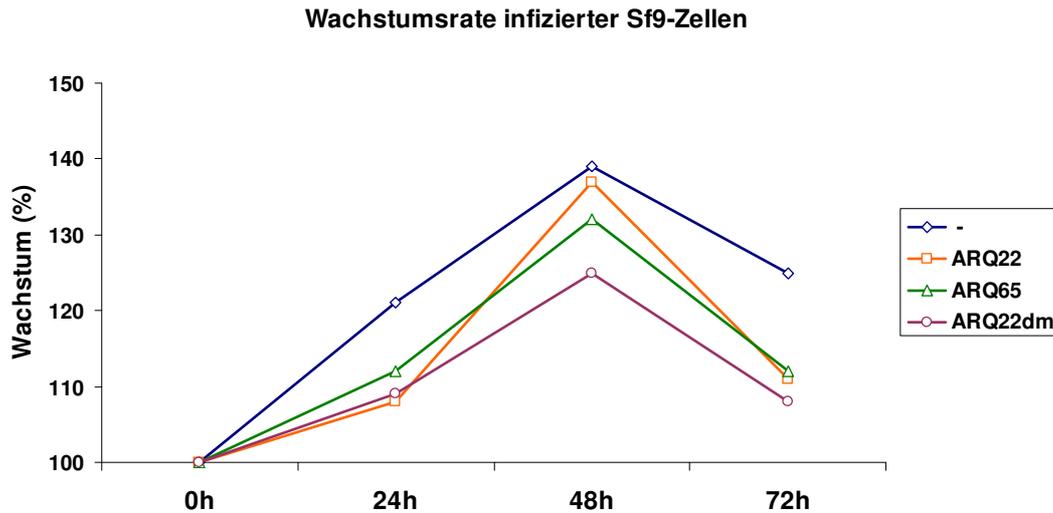
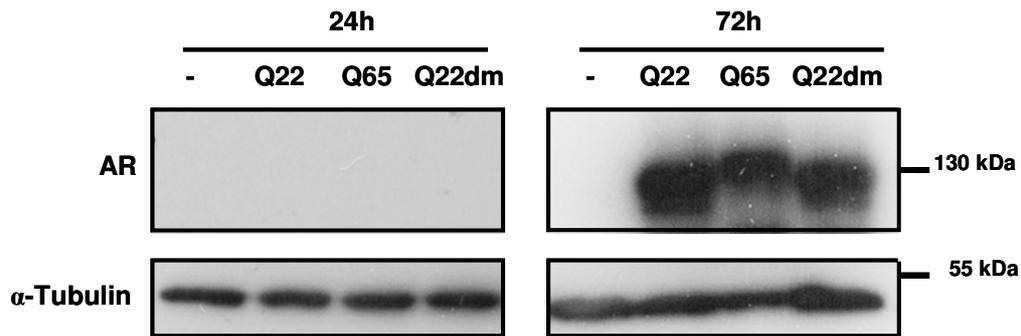


Abb. 3.11 Wachstumsrate AR-exprimierender Sf9 Zellen

Ca. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und zur Expression von ARQ22, ARQ65 und ARQ22dm mit Baculovirus-Partikeln versehen. Zur Kontrolle wurden zudem nicht infizierte Zellen ausgesät. Kurz nach der Infektion wurden die Zellen in Suspension gebracht. Jeweils 1×10^4 Zellen wurden in Triplikaten auf Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät. Für jeden zu untersuchten Zeitpunkt wurde eine separate Platte vorbereitet. Die Wachstumsrate wurde zum jeweiligen Zeitpunkt der Analyse mithilfe von Celltiter Blue® (Promega, Mannheim) ermittelt, indem die Zellen im Verhältnis 1:6 mit der Celltiter Blue®-Reagenz versehen wurden die Emission des dabei umgesetzten fluoreszenten Farbstoffes bei 580 nm und einer Verstärkung von 1400 in Triplikaten anhand eines FLUOstar OPTIMA (BMG Labtechnology, Offenburg) ermittelt wurde. Zur Erstellung der Wachstumskurve wurden die jeweils infizierten Zellen durch den an Tag 0 ermittelten Messwert dividiert und somit die Wachstumsrate nach ein bis drei Tagen Infektion ermittelt. In dieser Abbildung ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Mit der Wachstumsrate einhergehend, wurde die Expression der jeweiligen Androgenrezeptor-Konstrukte ermittelt. Aus infizierten bzw. nicht infizierten Zellen wurden nach 24 und 72h Infektion Proteinlysate hergestellt und die Expression des Androgenrezeptors anhand eines Western Blots ermittelt (Abb. 3.12). Während nach 24h Infektion noch überhaupt kein AR-Protein nachweisbar war, wurden alle drei AR-Konstrukte nach drei Tagen exprimiert, wobei ARQ22 etwas stärker hervortrat (Abb. 3.12).

**Abb. 3.12 Western Blot Analyse AR-exprimierender Sf9 Insektenzellen**

Ca. 1×10^6 Sf9 Zellen wurden ausgesät und mit ARQ22-, ARQ65- bzw. ARQ22dm-Baculovirus-DNA infiziert bzw. nicht infiziert. Nach 24 und 72h wurden die Zellen geerntet und Zellysate hergestellt, von welchen jeweils 5 μ l mithilfe eines 10 %-igen Polyacrylamid-Gels der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurden. Die Detektion des Androgenrezeptors erfolgte anhand des monoklonalen (Maus) AR F39.4.1 Antikörpers. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein α -Tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg), welches mithilfe eines monoklonalen α -Tubulin-Antikörpers sichtbar gemacht wurde.

3.2.2 Viabilität und Toxizität AR-exprimierender Sf9 Zellen

Es wurde bereits publiziert, dass der durch das Baculovirus-System in Insektenzellen rekombinant exprimierte Androgenrezeptor dieselben Hormon-Bindungseigenschaften aufwies wie der „echte“ (*bona fide*) Androgenrezeptor (Chang *et al.*, 1992).

Die Auswirkungen der Behandlung ARQ22-, ARQ65- und ARQ22dm-exprimierender Sf9 Zellen mit dem AR-Liganden DHT sowie mit Melatonin, für welches in vorangegangenen *Drosophila*-Studien ein *Rescue*-Effekt nachgewiesen wurde, wurden anhand einer Viabilitäts-Studie ermittelt. Es wurde bereits festgestellt, dass die dreitägige Infektion der Sf9 Zellen ausreichend war, um die AR-Konstrukte mit sehr hoher Effizienz zu exprimieren. Diese Zellen wurden für weitere 24h mit Ethanol (Ktr) bzw. DHT und/oder Melatonin behandelt. Anschließend wurde die Hormon-abhängige Viabilität der Zellen mithilfe von Celltiter Blue® ermittelt. Die Zellviabilität wurde pro AR-Konstrukt jeweils in Relation zur Kontrollbehandlung errechnet (Abb. 3.13).

Die Ergebnisse hierbei waren nahezu identisch, wenn die Zellen keinen oder den Wildtyp-Androgenrezeptor exprimierten. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Hormonbehandlung, jedoch war bei diesen Zellen nach Melatonin-Behandlung eine erhöhte Viabilität festzustellen. Exprimierten die Zellen hingegen ARQ65 und ARQ22dm, so war die Viabilität der Zellen nach 24-stündiger Anwesenheit des Hormons DHT signifikant reduziert, insbes. die Expression von ARQ65 induzierte Zelltoxizität. Die gleichzeitige Verabreichung von Melatonin konnte diesen Effekt in hohem Maße negieren und die Zellviabilität deutlich erhöhen. Statistisch signifikant war dieser *Rescue*-Effekt nur bei ARQ65-, nicht bei ARQ22dm-exprimierenden Sf9 Zellen, was bei ARQ22dm-exprimierenden Sf9 Zellen auf den vergleichsweise hohen Standardfehler zurückgeführt werden konnte (Abb. 3.13).

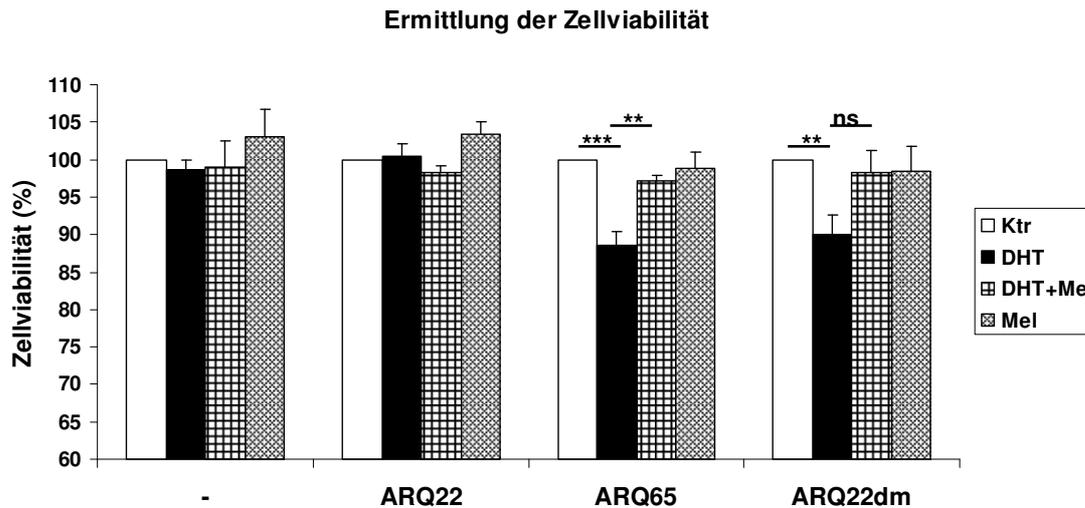


Abb. 3.13 Ermittlung der Viabilität AR-exprimierender Sf9 Zellen nach Hormonbehandlung

Rund 1×10^6 Sf9 Zellen wurden ausgesät und mit ARQ22-, ARQ65- bzw. ARQ22dm-Baculovirus-DNA infiziert bzw. nicht infiziert. Nach 72h wurden die Zellen in Suspension gebracht und jeweils 1×10^4 Zellen mit DHT und/oder Melatonin bzw. Ethanol als Kontrolle (Ktr) in Triplikaten auf Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät. Nach 24-stündiger Hormonbehandlung wurde die Viabilität der Zellen mittels Celltiter Blue® (Promega, Mannheim; Verhältnis der Reagenz 1:6) bei 540 nm Extinktion/580 nm Emission und einer Verstärkung von 1400 in einem FLUOstar OPTIMA (BMG Labtechnology, Offenburg) ermittelt. Pro Infektionsansatz wurde der ermittelte Messwert in Relation zur Kontrollbehandlung gesetzt und die prozentuale Viabilität der Zellen ermittelt. Zweiseitiger T-Test Typ 2, $n=3-4$ in Triplikaten, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns: nicht signifikant, SEM.

Zur Überprüfung, ob die 24-stündige Hormonbehandlung Einfluss auf die Expression des Androgenrezeptors genommen hatte, wurden Western Blot Analysen durchgeführt, anhand derer die Expression des Androgenrezeptors bzw. des Haushaltsproteins α -Tubulin, welches als Kontrolle diente, untersucht wurde (Abb. 3.14).

Dabei zeigte sich, dass am Ende des Experiments nach 4 Tagen Infektion mit den jeweiligen AR-Konstrukten zwar die Expression der untersuchten AR-Konstrukte (ARQ22, ARQ65 und ARQ22dm) jeweils unterschiedlich stark nachzuweisen war, es jedoch innerhalb eines jeden AR-Konstrukts keine Hormon-abhängigen Unterschiede bezüglich der Expression des Androgenrezeptors gab, sodass sowohl DHT, als auch Melatonin keinen Einfluss auf die Expression des jeweiligen Androgenrezeptor-Konstrukts nahmen.

Zusammengenommen führten die Studien an Sf9 Zellen zu dem Ergebnis, dass die Expression der pathologischen AR-Konstrukte ARQ65 und ARQ22dm die Wachstumsrate der Zellen *per se* verzögerte, dies jedoch in Anwesenheit von DHT noch verstärkt wurde, sodass diese Zellen signifikant weniger vital waren und sich damit vermehrt Zelltoxizität abzeichnete. Die gleichzeitige Inkubation mit Melatonin konnte die Viabilität dieser Zellen nahezu wieder auf Kontrollniveau bringen. Die Expression des Androgenrezeptors wurde von der Hormonbehandlung aber nicht beeinflusst.

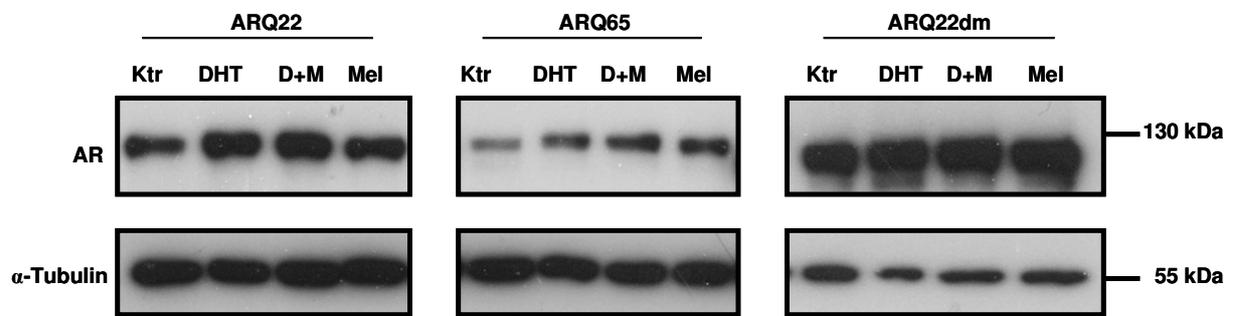


Abb. 3.14 Western Blot Analyse AR-exprimierender Sf9 Zellen nach Hormonbehandlung

Ca. 1×10^6 Sf9 Zellen wurden ausgesät und mit Baculovirus-Partikeln infiziert, sodass die Zellen ARQ22, ARQ65 bzw. ARQ22dm exprimierten. Nach 72h wurden die Zellen für weitere 24h mit Ethanol (Ktr), DHT und/oder Melatonin behandelt und anschließend Zellysate hergestellt, von welchen jeweils 9 μ l mithilfe eines 10 %-igen Polyacrylamid-Gels der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurden. Die Detektion des Androgenrezeptors erfolgte anhand des monoklonalen (Maus) AR F39.4.1 Antikörpers. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein α -Tubulin, welches mithilfe eines monoklonalen α -Tubulin -Antikörpers sichtbar gemacht wurde.

3.3 Expression des Androgenrezeptors in Säugerzellen

3.3.1 Wirkungen von Melatonin auf die Lokalisation und Aggregation des Androgenrezeptors

In *Drosophila* Lokomotions- und Kurzzeitüberlebens-Studien sowie in morphologischen Analysen der neuromuskulären Verbindungen konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Hormons Melatonin den DHT-induzierten Phänotyp in ARQ65- und ARQ22dm-exprimierenden Fliegen signifikant verbesserte. In Sf9 Insektenzellen wurde die Androgen-abhängige Toxizität dieser Androgenrezeptor-Konstrukte in einer Viabilitäts-Analyse nachgewiesen. Gleichzeitig konnte der positive Effekt von Melatonin bestätigt werden; war bei der DHT-Behandlung Melatonin anwesend, konnte die Viabilität ARQ65- und ARQ22dm-infizierter Sf9 Zellen annähernd wieder auf Kontrollniveau gebracht werden.

Drosophila eignete sich hierbei bestens als *in vivo* Modell zur Untersuchung der Pathogenizität der exprimierten AR-Konstrukte. Sf9 Zellen konnten aufgrund der hohen Effizienz der AR-Exprimierung zur Analyse der sensiblen Wirkungen, welche DHT bzw. Melatonin auf die Zellen ausübten, hervorragend verwendet werden. Zu weiteren *in vitro* Analysen jedoch erwiesen sich diese Insektenzellen insofern als ungeeignet, als dass sie sehr klein und rund waren und sich deswegen für immunhistochemische Färbungen nicht verwenden ließen. Um einen weiteren Einblick in die Androgen-abhängige Wirkungsweise der pathologischen AR-Konstrukte sowie der Melatonin-Effekte in einem Säuger-System zu erlangen, wurde von den leicht transfizierbaren, gut etablierten AR-defizienten COS-7 Säugerzellen Gebrauch gemacht. Diese Zellen wurden bereits in zahlreichen Studien zu polyQ-Krankheiten im Allgemeinen (Chai *et al.*, 1999, Nagai *et al.*, 1999, Ho *et al.*, 2001, Mazzucchelli *et al.*, 2009) und zur Untersuchung spinaler und bulbärer Muskelatrophie im Speziellen (Becker *et al.*, 2000, Ishihara *et al.*, 2003, Funderburk *et al.*, 2008) eingesetzt.

COS-7 Zellen wurden in der hier vorgestellten Arbeit als Modell herangezogen, um die Auswirkungen von Melatonin auf die Lokalisation des Wildtyp- und pathologischen Androgenrezeptors sowie die Effekte von Melatonin auf die Aggregatbildung des Androgenrezeptors zu untersuchen.

3.3.2 Effekt von Melatonin auf die subzelluläre Lokalisation des Androgenrezeptors

In Abwesenheit von Androgenen ist der Androgenrezeptor vorwiegend im Zytoplasma vorzufinden, wo er in einen Proteinkomplex integriert ist, welcher dem AR Ligandenbindung gestattet, transkriptionelle Aktivität jedoch unterbindet (Marivoet *et al.*, 1992, Pratt und Toft, 1997, Pratt *et al.*, 2004). Nach dem Binden seines Liganden wird der AR als Typ I nukleärer Transkriptionsfaktor dann vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert (Gioeli *et al.*, 2006, Orr *et al.*, 2010), wo er seine transkriptionelle Aktivität entfaltet (Jenster *et al.*, 1993, Zhou *et al.*, 1994, Brooks und Fischbeck, 1995). Nukleäre Translokation ist damit ein eindeutiges Zeichen für die Aktivierung des Androgenrezeptors.

Um zu untersuchen, ob der mutierte Androgenrezeptor gleichermaßen wie der Wildtyp-AR in den Zellkern transportiert werden würde, wurde die subzelluläre Lokalisation des AR im Zytoplasma bzw. im Nukleus anhand von Zellfraktionierungen und immunhistochemischen Färbungen AR-exprimierender COS-7 Zellen ermittelt.

3.3.2.1 Zellfraktionierungen

Zunächst wurde anhand von Zellfraktionierungen in den zytoplasmatischen und nukleären Zellbestandteil untersucht, ob zum einen Unterschiede bezüglich der Androgen-abhängigen subzellulären Lokalisation des Wildtyp-AR bzw. des polyQ-erweiterten AR zu erkennen sein würden. Zum anderen wurde die Wirkung von Melatonin auf die Lokalisation des Androgenrezeptors analysiert.

Dazu wurden COS-7 Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät und transient mit ARQ22- und ARQ65-Expressionsplasmiden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 3h mit Ethanol (Kontrolle), DHT und/oder Melatonin behandelt. Zur Kontrolle wurden untransfizierte, unbehandelte Zellen in nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen unterteilt. Die Zellfraktionen wurden mittels Western Blot Analyse bezüglich der subzellulären Lokalisation des Androgenrezeptors untersucht. Dieser wurde mithilfe eines AR-Antikörpers detektiert; die Reinheit der Zellfraktionen wurde überprüft, indem spezifische nukleäre bzw. zytoplasmatische Proteine markiert wurden: Im Falle der Fraktionierung ARQ22-exprimierender COS-7 Zellen wurde das Haushaltsprotein α -Tubulin sichtbar gemacht (Abb. 3.15 A), welches als Bestandteil des Zytoskeletts ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion zu finden sein sollte. Die Fraktionierungseffizienz ARQ65-exprimierender Zellen wurde anhand des nukleären Proteins Histondeacetylase 2 (HDAC2) detektiert. Die Fraktionierungen waren insgesamt sehr sauber, jedoch waren nach der Fraktionierung ARQ65-transfizierter Zellen leichte Verunreinigungen zu verzeichnen (Abb. 3.15 B). Als Ladekontrolle diente die Detektion des Proteins β -Aktin.

Wie in Abb. 3.15 zu sehen ist, exprimierten COS-7 Zellen kein endogenes AR-Protein (NT, nicht transfiziert). Wurden die Zellen mit ARQ22- oder ARQ65-Expressionsplasmiden transfiziert, so war nach Kontrollbehandlung der Großteil des AR in der zytoplasmatischen Fraktion (CF) detektierbar. DHT-Behandlung führte dazu, dass der Wildtyp-AR fast ausschließlich in der nukleären Fraktion (NF) vorzufinden war (Abb. 3.15 A), wohingegen ARQ65 in der nukleären und zytoplasmatischen Fraktion etwa gleichermaßen verteilt war (Abb. 3.15 B). Jeweils nach Behandlung mit einer Kombination aus DHT und Melatonin war das Ergebnis vergleichbar mit jenem, welches durch DHT-Behandlung erhalten wurde; es hatte sogar den Anschein, als ob die

Akkumulation des Androgenrezeptor im Nukleus noch ein wenig stärker gewesen wäre, wenn Melatonin anwesend war, insbes. bei ARQ22. Wurden die Zellen nur mit Melatonin behandelt, so war im Vergleich zur Kontrollbehandlung festzustellen, dass ein Teil des Androgenrezeptors nun ebenfalls in der nukleären Fraktion nachweisbar war. Es hatte den Anschein, als ob nach Melatonin-Behandlung mehr ARQ22-Protein im Zellkern detektierbar war als ARQ65-Protein, jedoch war bei dieser Fraktionierung ARQ65-exprimierender COS-7 Zellen sowohl weniger β -Aktin, als auch weniger HDAC2 nachzuweisen, sodass auch hier im Vergleich zur Kontrollbehandlung mehr AR im Zellkern akkumuliert war (Abb. 3.15 B).

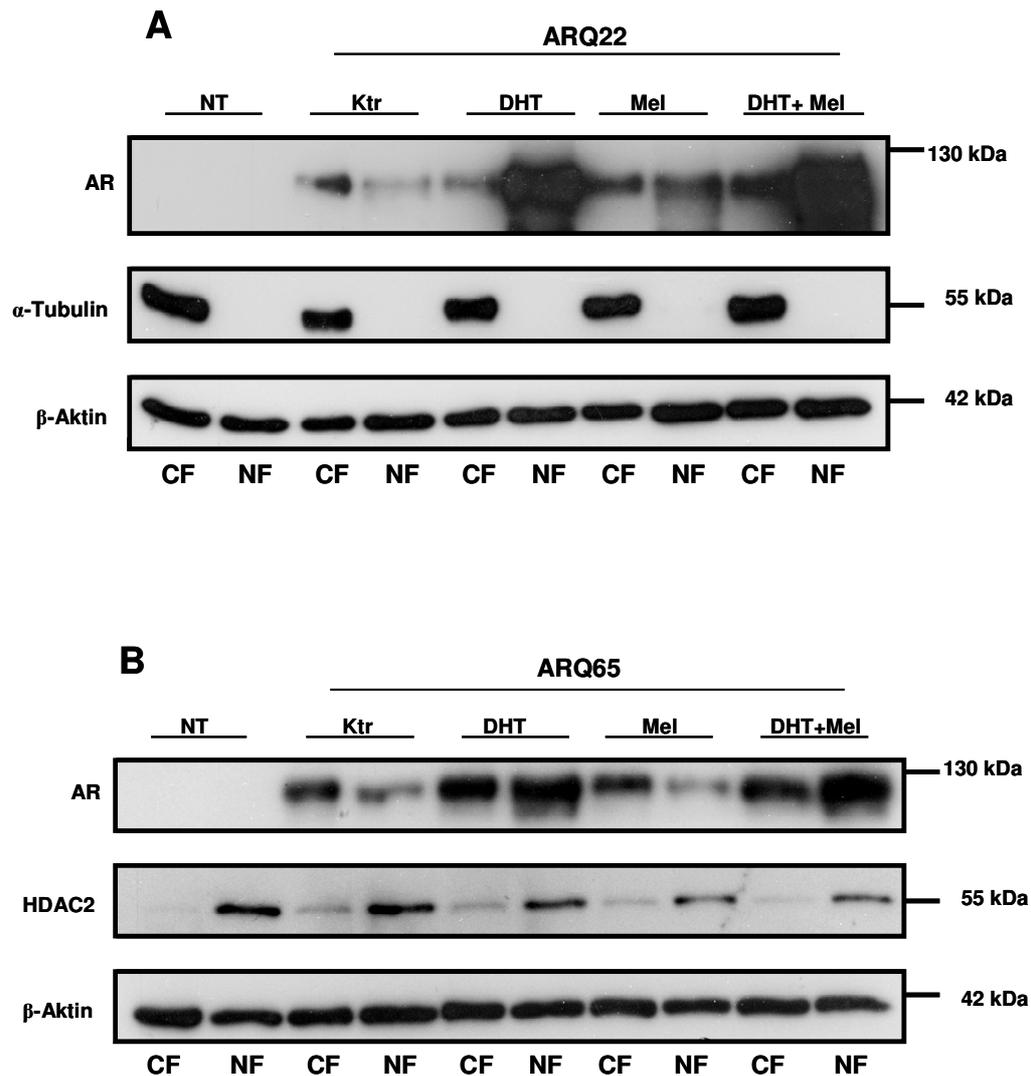


Abb. 3.15 Subzelluläre Fraktionierung ARQ22- und ARQ65-exprimierender COS-7 Zellen

8×10^4 COS-7 Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät und 24h starviert. Die Zellen wurden mit pSGARQ22- (A) oder pSGARQ65- (B) Expressionsplasmiden transfiziert und in ihre zytoplasmatischen (CF) und nukleären (NF) Bestandteile getrennt und die Lokalisation des Androgenrezeptors nach 3h Behandlung mit Ethanol (Ktr), DHT und/oder Melatonin erörtert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich nicht transfizierte (NT), unbehandelte Zellen fraktioniert. Nach der Fraktionierung wurde der jeweilige Proteingehalt bestimmt und jeweils 40 μ g Gesamtprotein mithilfe eines 10 %-igen Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblotet. Der AR wurde anhand des monoklonalen AR 441-Antikörpers detektiert. Zur Bestimmung der Reinheit der Fraktionen wurden diese entweder mit einem Antikörper gegen das zytoplasmatische Protein α -Tubulin (A) oder gegen das nukleäre Protein HDAC2 (B) inkubiert. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein β -Aktin.

3.3.2.2 Immunhistochemische Färbungen

Die Zellfraktionierungen aus 3.3.1.1 gaben erste Aufschlüsse über die subzelluläre Lokalisation des Androgenrezeptors nach DHT- und Melatonin-Behandlung. Immunhistochemische Färbungen sollten nun helfen, die Hormon-abhängige subzelluläre Lokalisation des Androgenrezeptors zu unterschiedlichen Zeitpunkten *in situ* zu untersuchen.

Dazu wurden COS-7 Zellen mit ARQ22- und ARQ65-Expressionsplasmiden transfiziert. Zusätzlich wurde die Lokalisation des Wildtyp-AR, welcher zwei Aminosäure-Mutationen an Serin 424 und 514 aufwies (ARQ22dm), analysiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen unterschiedlich lange (30 min, 3h und 6h) mit Ethanol (Ktr), DHT und/oder Melatonin behandelt, um zu ermitteln, wie die Expression des Wildtyp-AR sowie die Expression der beiden pathologischen AR-Konstrukte ARQ65 und ARQ22dm die zytoplasmatisch-nukleäre Translokation Hormon-abhängig beeinflussen würde. Nachdem die Zellen fixiert, permeabilisiert und der Androgenrezeptor mithilfe eines AR-Antikörpers und eines sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörpers markiert worden war, wurden die Zellen bezüglich der nukleären bzw. zytoplasmatischen Lokalisation mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops „blind“ analysiert. Die prozentuale subzelluläre Verteilung in Bezug auf die jeweils untersuchte Gesamtzellzahl wurde errechnet. Bei der Analyse wurde die Lokalisation des AR innerhalb der Zelle in vier Phasen kategorisiert (vgl. Abb. 3.16):

Bezeichnung	AR-Lokalisation
C>N	AR nur im Zytoplasma
C≥N	AR größtenteils im Zytoplasma
N≥C	AR größtenteils im Nukleus
N>C	AR ausschließlich im Nukleus

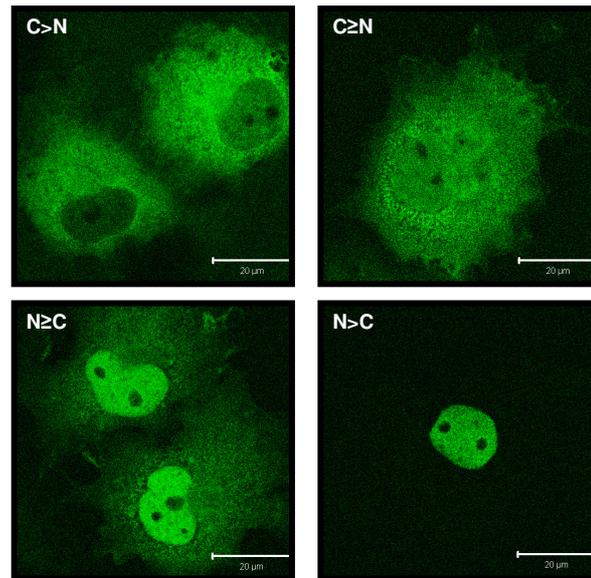


Abb. 3.16 Kategorisierung der subzellulären Lokalisation des AR nach Hormonbehandlung

5×10^4 COS-7 Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und mit ARQ22-, ARQ65- oder ARQ22dm-Expressionsvektoren transient transfiziert und mit Ethanol (Ktr), DHT und/oder Melatonin für 30 min, 3h oder 6h behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und der AR mithilfe monoklonalen F39.4.1 AR-spezifischen Primär- und eines Alexa Fluor® 488 Sekundärantikörpers behandelt, wodurch der AR in grüner Farbe detektiert werden konnte. Es wurden vier Phasen der AR-Translokalisierung unterschieden, welche hier dargestellt sind: Phase 1: Der AR war ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert (C>N), Phase 2: Der AR war größtenteils im Zytoplasma nachzuweisen (C≥N), Phase 3: Der AR war großteils in den Zellkern immigriert (N≥C) und Phase 4: Der AR war ausschließlich im Nukleus anzutreffen (N>C). Die Bilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Jena) mit einem 63x-Objektiv und zweifachem Zoom aufgenommen. Der Balken gibt eine Größe von 20 μm an. Die jeweilige subzelluläre Lokalisation ist in Abb. 3.18 ausgewertet.

Die Analysen der immunhistochemischen Färbungen ergaben, dass der AR nach Kontrollbehandlung unabhängig vom exprimierten AR-Konstrukt fast ausschließlich komplett bzw. hauptsächlich im Zytoplasma vorzufinden war (Abb. 3.17). Wurden die Zellen hingegen für unterschiedliche Zeiten mit dem Androgen DHT behandelt, so ergab sich ein anderes Ergebnis. Die Expression von ARQ22 und ARQ22dm ließ insgesamt keine Unterschiede erkennen; sowohl der native Wildtyp-AR als auch der Wildtyp-AR mit der Doppelmutation waren in den Nukleus translokalisiert. Bei ARQ65-exprimierenden Zellen jedoch war die zytoplasmatisch-nukleäre Translokation im Vergleich zu ARQ22-exprimierenden Zellen stets verzögert, was nach 3h und 6h DHT-Behandlung signifikant war, und stimmte somit mit den aus den Fraktionierungen erlangten Ergebnissen überein (s. Abb. 3.15). Die gleichzeitige Anwesenheit von Melatonin führte zu keinerlei Unterschieden im Vergleich zur DHT-Behandlung mit der Ausnahme von ARQ65 nach 3h Behandlung, wobei Melatonin die DHT-induzierte nukleäre Lokalisation des AR verstärken konnte. Die Behandlung mit Melatonin in Abwesenheit von Androgen hatte zur Folge, dass ein beachtlicher Teil des AR zum Teil oder ausschließlich in den Zellkern translokalisierte. Es war kein polyQ-abhängiger Unterschied festzustellen, was ebenfalls mit den Ergebnissen aus den Zellfraktionierungen in Einklang stand.

Diese Studie führte zu zweierlei Ergebnissen: Zum einen konnte festgehalten werden, dass der polyQ-expandierte Androgenrezeptor signifikant langsamer in den Nukleus importiert worden war als AR-Konstrukte, welche einen Wildtyp-polyQ-Trakt exprimierten, sodass diese Translokation abhängig von der Länge des polyQ-Traktes zu erfolgen schien und die Doppelmutation keinen Einfluss auf diesen Mechanismus ausübte. Darüber hinaus induzierte Melatonin den Import des AR in den Zellkern, sodass es den Anschein hatte, als könnte Melatonin den AR teilweise genauso aktivieren wie DHT.

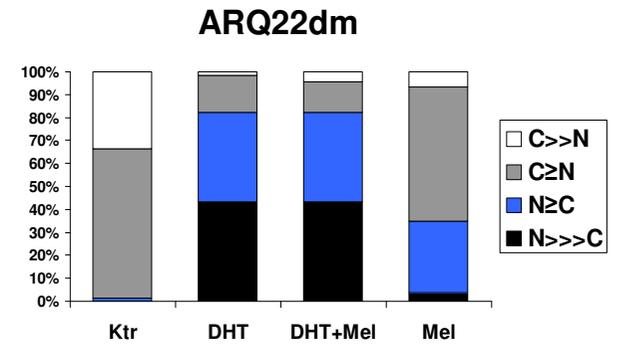
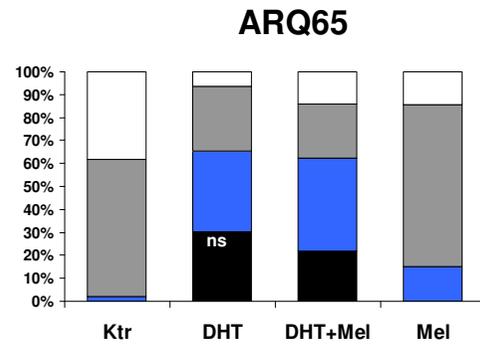
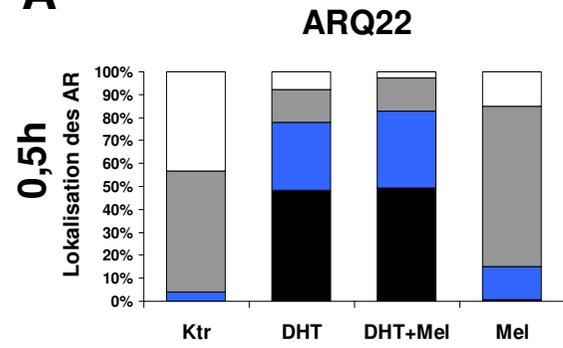
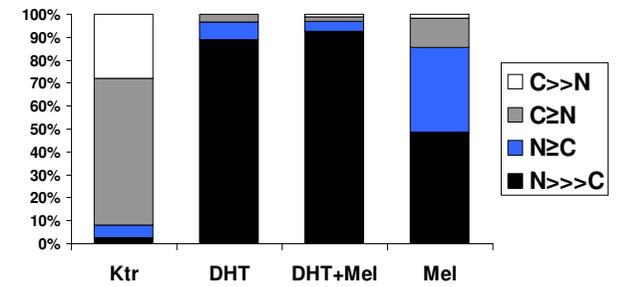
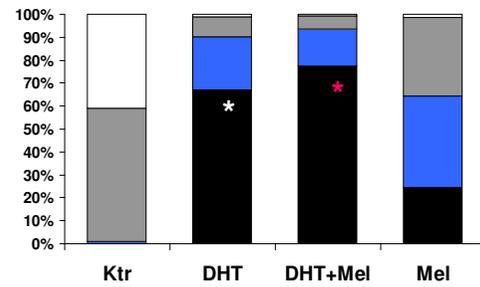
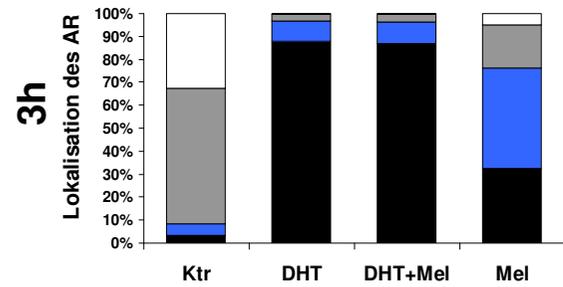
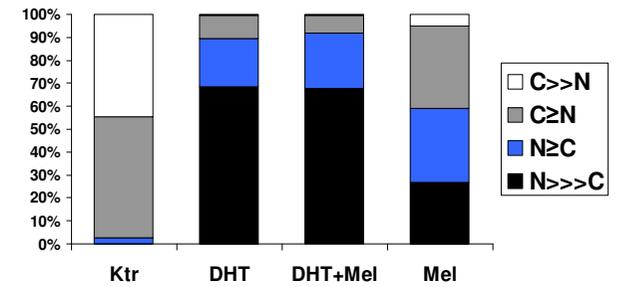
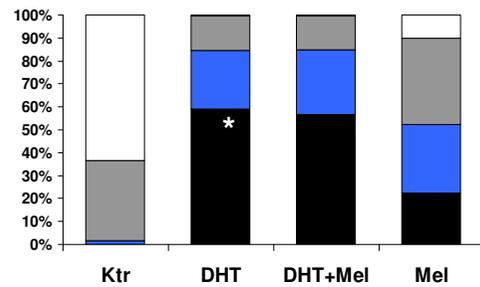
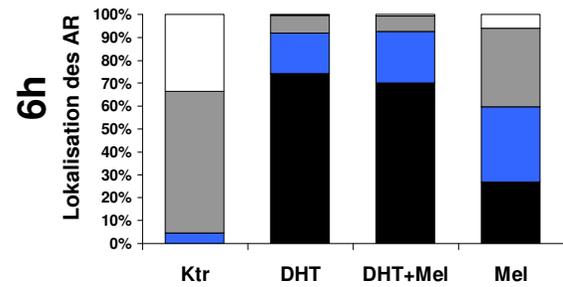
A**B****C**

Abb. 3.17 Zeit- und Hormon-abhängige subzelluläre Lokalisation des AR

5x10⁴ COS-7 Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und mit ARQ22-, ARQ65- oder ARQ22dm-Expressionsvektoren transient transfiziert und mit Ethanol (Ktr), DHT und/oder Melatonin für 30 min, 3h oder 6h behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und der AR mithilfe des monoklonalen F39.4.1 AR-spezifischen Primär- und eines Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpers an einem Zeiss LSM510 META (Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) bei 630-facher Vergrößerung detektiert. Die subzelluläre AR-Verteilung wurde in vier Phasen kategorisiert (vgl. Abb. 3.17): Phase 1: Der AR war ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert (C>N), Phase 2: Der AR war größtenteils im Zytoplasma nachzuweisen (C≥N), Phase 3: Der AR war größtenteils in den Zellkern immigriert (N≥C) und Phase 4: Der AR war ausschließlich im Nukleus anzutreffen (N>C). Weiße Sternchen: ARQ65 jeweils verglichen mit ARQ22. Rotes Sternchen: ARQ65 DHT + Mel verglichen mit ARQ65 DHT. n=3-4 à ≥ 200 Zellen. Zweiseitiger T-Test Typ 2. * p>0,05, ns: nicht signifikant, SEM.

3.3.3 Effekt von Melatonin auf die Aggregatbildung des Androgenrezeptors

Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation des AR (Abb. 3.17) wurde beobachtet, dass der AR zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Hormonbehandlung große, unter dem Lichtmikroskop sichtbare Aggregate in den COS-7 Zellen bildete. Aggregate sind ein Merkmal aller polyQ-Proteine (Davies *et al.*, 1997, DiFiglia *et al.*, 1997). Diese wurden zuerst in den Neuronen transgener Maus-Modelle von Huntington entdeckt (Davies *et al.*, 1997, DiFiglia *et al.*, 1997) und schließlich in den Gehirnen von Patienten mit allen bisher identifizierten polyQ-Erkrankungen nachgewiesen (Ross, 1997, Davies *et al.*, 1999, Review Bauer und Nukina, 2009). Bei SBMA traten Aggregate des Androgenrezeptors insbes. in den degenerierenden Motorneuronen des Stammhirns und des Rückenmarks in Augenschein (Yamada *et al.*, 2008, Banno *et al.*, 2009b, aus Review Ranganathan und Fischbeck, 2010) und wurden sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma gefunden (Adachi *et al.*, 2005).

Die makromolekularen AR-Aggregate, welche in dieser Arbeit anhand der immunhistochemischen Färbungen im Zytoplasma der AR-transfizierten COS-7 Zellen beobachtet wurden, hatten eine Größe von mindestens 1 μm . Mindestens 200 Zellen wurden jeweils gezählt und der prozentuale Anteil Aggregate-positiver Zellen ermittelt (Abb. 3.18).

Diese Analysen ergaben, dass eine minimale Anzahl Wildtyp-AR-exprimierender Zellen DHT-induzierte Aggregatbildung aufwies. Die Expression des polyQ-amplifizierten Androgenrezeptors hingegen hatte zur Folge, dass im Vergleich zum Wildtyp-AR signifikant viele Zellen makromolekulare Aggregate aufwiesen, welche anfänglich eine globuläre Form aufwiesen im Laufe der Zeit in ihrer Anzahl und in der Zahl der Aggregate pro Zelle abnahmen, an Größe hingegen zunahm und so nach 6h DHT-Behandlung einen Durchmesser von ca. 2,5 μm erreicht hatten. Es hatte den Anschein, als ob die abnehmende Anzahl an zellulären Aggregaten mit der Größenzunahme der Aggregate in Verbindung stand. Wie in Abb. 3.19 dargestellt ist, konnte beobachtet werden, dass zwei Aggregate zu verschmelzen schienen, sodass es den Eindruck machte, als ob nach längerer Hormonbehandlung keine *de novo* Aggregatbildung stattfand, sondern die bereits bestehenden annulären Inklusionen zu größeren Inklusionen fusionierten (Abb. 3.19).

Die gleichzeitige Inkubation mit Melatonin konnte die Aggregatbildung deutlich beeinflussen, indem das Hormon die Anzahl Aggregate-positiver ARQ65-exprimierender Zellen signifikant verringerte, jedoch schien dieser *Rescue*-Effekt von Melatonin nach einer gewissen Dauer der Anwesenheit von DHT nachzulassen, sodass dieser Effekt nach 6h gleichzeitigen Vorhandenseins von DHT nicht mehr statistisch signifikant war (Abb. 3.18). Eine Wirkung von Melatonin auf die makromolekulare Aggregatbildung des Androgenrezeptors könnte eine mechanistische Erklärung liefern, wie die in den *Drosophila*-Studien erhaltenen *Rescue*-Effekte von Melatonin zu erklären sein konnten. Allerdings ergaben die immunhistochemischen Studien an COS-7 Zellen, dass ARQ22dm zwar eine Tendenz zur DHT-induzierten Aggregatbildung erkennen ließ, diese jedoch deutlich weniger ausgeprägt war als bei ARQ65, sodass durch diesen Mechanismus die neurodegenerativen Defekte bei *Drosophila* sowie die verminderte Zellviabilität in Sf9 Insektenzellen nicht zu erklären gewesen waren.

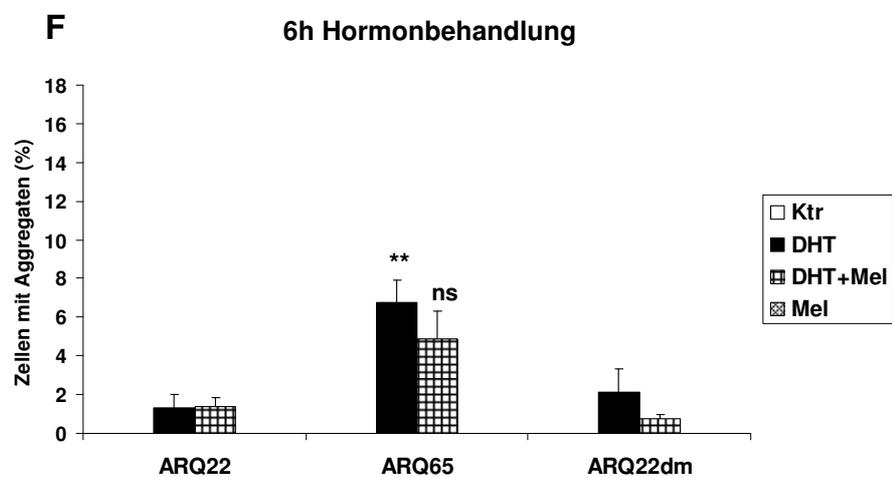
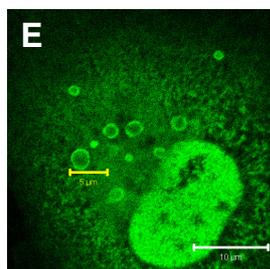
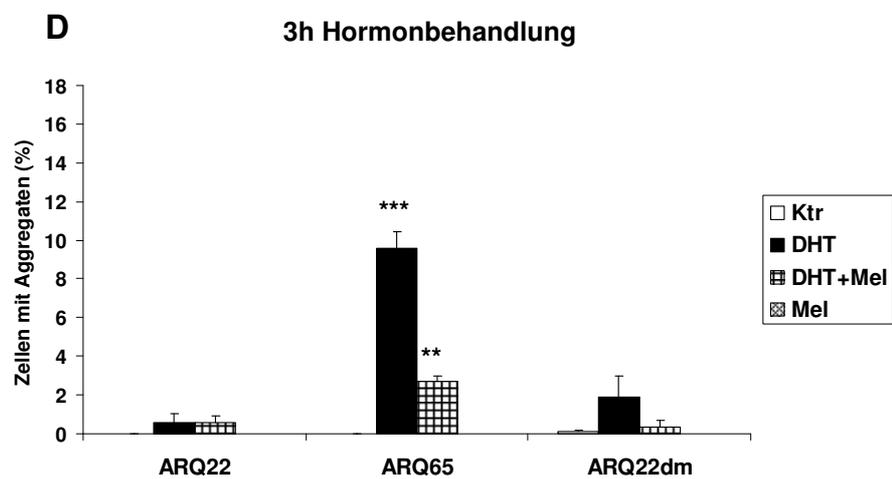
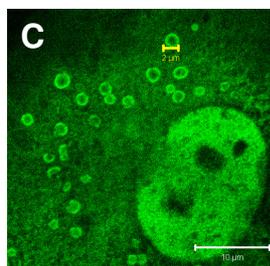
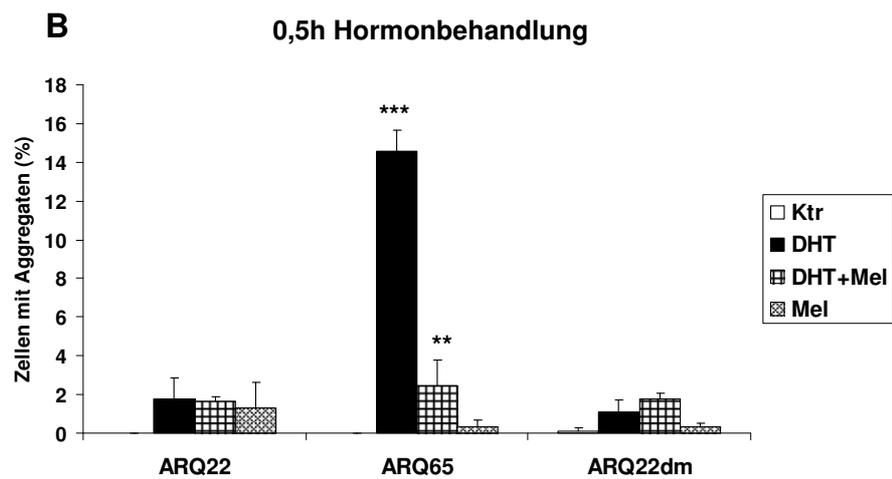
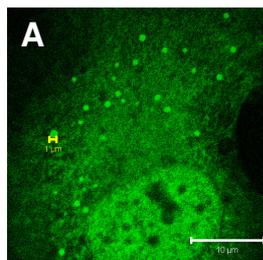
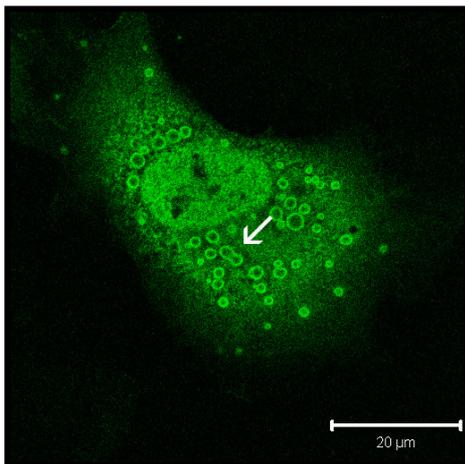


Abb. 3.18 Analyse der Aggregatbildung AR-exprimierender COS-7 Zellen

5×10^4 COS-7 Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und mit ARQ22-, ARQ65- oder ARQ22dm-Expressionsvektoren transient transfiziert und mit Ethanol (Ktr), DHT und/oder Melatonin für 30 min, 3h oder 6h behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und der AR mithilfe des F39.4.1 AR-spezifischen Primär- und eines Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpers an einem Zeiss LSM510 META (Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) bei 630-facher Vergrößerung detektiert. Die Anzahl Aggregat-positiver Zellen wurde erfasst und prozentual zur Gesamtzahl analysierter Zellen pro Konstrukt und Behandlung errechnet (B, D, F). In A, C und E ist jeweils eine Zelle mit Zellkern (untere Ecke rechts; 630-fache Vergrößerung, zweifacher Zoom) mit zytoplasmatischen Aggregaten dargestellt. Weißer Balken: 10 μm . Gelbe Balken: A: 1 μm , C: 2 μm , E: 5 μm . $n=3-4 \rightarrow \geq 200$ Zellen. Zweiseitiger T-Test Typ 2. ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$, ns: nicht signifikant, SEM.

**Abb. 3.19 Darstellung zweier fusionierender AR-Aggregate**

COS-7 Zellen wurden transfiziert, fixiert und der AR markiert. Dargestellt ist eine ARQ65-exprimierende Zelle nach DHT-Behandlung. Der weiße Pfeil weist auf zwei Aggregate hin, welche gerade zu einem größeren zu fusionieren scheinen. Der weiße Balken gibt eine Länge von 20 μm an. Aufgenommen mit einem Zeiss LSM510 META (Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) bei 630-facher Vergrößerung.

3.3.4 Wirkung von Melatonin auf die Liganden-Bindedomäne des Androgenrezeptors

Da Melatonin insbes. das DHT-abhängige Aggregationsverhalten des polyQ-amplifizierten Androgenrezeptors signifikant unterband und darüber hinaus ein Teil des AR durch Melatonin in den Nukleus importiert worden war, stellte sich die Frage, ob Melatonin am selben Ort, an welchem DHT mit dem Androgenrezeptor interagiert – die Liganden-Bindedomäne – auf den AR wirken könnte. Um dies zu untersuchen, wurde eine Hormon-Bindestudie durchgeführt (PolarScreen™ Androgen Receptor Competitor Assay, Green Protocol, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Das Prinzip dieser Studie basierte darauf, dass ein fluoreszenter Androgenrezeptor-Ligand (Fluormone™ AL Green; Fluo) mit der Liganden-Bindedomäne (LBD) einen Komplex bildete, welcher anschließend zu einem hohen Polarisationsignal führte. In Anwesenheit höherer Konzentrationen des AR-Liganden DHT würde das fluoreszente Fluormone™ aus dem Komplex verdrängt werden und in Lösung zu einem niedrigeren Polarisationsignal führen. Zum Etablieren des Systems wurde das Polarisationsignal in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des affinen AR-Liganden DHT ermittelt; als Negativkontrolle wurde Dexamethason verwendet, welches kein Ligand des Androgenrezeptors ist und nicht an die LBD des AR binden sollte. Melatonin wurde verwendet, um zu untersuchen, ob es das Fluormone™ aus seinem Komplex verdrängen und zu einem niedrigen Polarisationsignal führen würde. Das Experiment wurde laut Herstellerprotokoll pro Versuchsansatz mit einer Konzentration von 25 nM AR-LBD und 1 nM Fluormone™ durchgeführt. Die Polarisationswerte wurden an einem infinite F200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich) nach einer 4-stündigen Inkubationszeit in Triplikaten gemessen und daraus Mittelwerte erstellt (Abb. 3.20).

Die Hormon-Bindestudie führte zu dem Ergebnis, dass der Komplex aus dem Fluormone™ und der AR-LBD einen Polarisationswert von ca. 260 mPU lieferte, wohingegen ansteigende Konzentrationen des Liganden DHT das Fluormone™ aus diesem Komplex zunehmend verdrängte, was sich in einem niedrigeren Polarisations-Signal äußerte, welches sich dem Polarisationswert des freien Fluormones™ (150 mPU) annäherte. Ein anderes Bild ergab sich, wenn die Bindestudie mit verschiedenen Konzentrationen von Melatonin (Mel) oder Dexamethason (Dex) durchgeführt wurde.

Hier konnte keine Verdrängung des Fluormones™ beobachtet werden; die Polarisationswerte waren sogar mit zunehmender Hormonkonzentration erhöht, sodass aus diesen Ergebnissen geschlossen werden konnte, dass weder Dexamethason, noch Melatonin an die Liganden-Bindedomäne des Androgenrezeptors banden (Abb. 3.20).

Diese Ergebnisse schlossen daher eine direkte Bindung von Melatonin an den Wirkungsort von DHT auf den AR aus; eine Möglichkeit, wie dieses Hormon auf den Androgenrezeptor wirkte, könnte sein, dass Melatonin an anderer Stelle an den AR band oder aber, dass seine Wirkung indirekter Natur war.

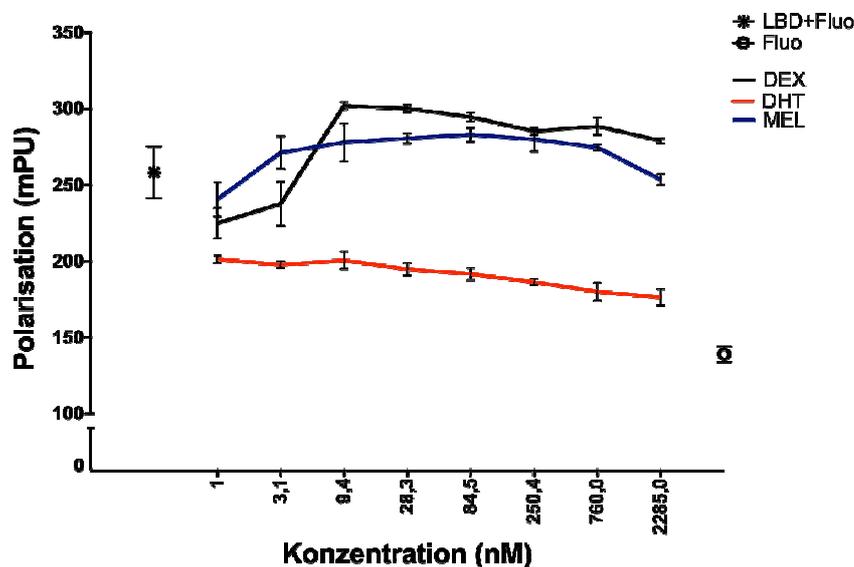


Abb. 3.20 Hormon-Bindestudie

Zur Untersuchung, ob Melatonin an die Ligandenbindedomäne des Androgenrezeptors binden würde, wurden eine Hormon-Bindestudie mit PolarScreen™ Androgen Receptor Competitor Assay, Green Protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Dazu wurden 25 nM AR-Ligandenbindedomäne (LBD) und 1 nM Fluormone™ zusammengebracht und mit den ausgewiesenen Konzentrationen an DHT (rote Linie), Dexamethason (schwarze Linie) oder Melatonin (blaue Linie) versehen. Nach einer Inkubationszeit von 4h bei Raumtemperatur wurden die Polarisationswerte an einem Messgerät (infinite F200, Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich) mit einem Interferenz-Filter bei 485 nm Extinktion und 535 nm Emission in Triplikaten gemessen. Als Kontrollen wurde sowohl der Polarisationswert, welcher aus dem Komplex der LBD mit dem Fluormone™ hervorging (hohe Polarisation), als auch freies Fluormone™ in Lösung (niedrige Polarisation) ermittelt.

3.3.5 Effekt der N/C-Interaktion auf die Aggregation des Androgenrezeptors

Im Zytoplasma befindet sich der AR in einer Konformation, welche das Binden von Hormonen gestattet (Pratt und Toft, 1997, Pratt *et al.*, 2004) und transkriptionelle Aktivität verhindert (Marivoet *et al.*, 1992). Nach der Ligandenbindung erfährt der AR Konformationsänderungen wie die wichtige Interaktion des N-terminalen FxxLF-Motivs, welches sich über Aminosäure 23-27 erstreckt (genau: ²³FQNLF²⁷) (Ikonen *et al.*, 1997, He *et al.*, 1999, 2000), mit der C-terminal gelegenen AF-2 Domäne, wodurch der AR-Androgen-Komplex stabilisiert und anschließende transkriptionelle Steuerung durch die Rekrutierung von Ko-Aktivatoren ermöglicht wird (Ikonen *et al.*, 1997, Orr *et al.*, 2010).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Aminosäure-Austausch dieses N-terminalen FxxLF-Motivs zu AxxLF ausreichend war, um die Liganden-induzierte Dissoziationsrate des Wildtyp-AR signifikant zu reduzieren (He *et al.*, 2000). Darüber hinaus publizierte die Arbeitsgruppe um Orr, dass diese Mutation genügte, um in ARQ110 die DHT-abhängige Bildung von Aggregaten und die Toxizität, gezeigt anhand einer verringerten Anzahl toter Zellen, des polyQ-amplifizierten AR in PC12 Zellen signifikant zu vermindern (Orr *et al.*, 2010).

Zur Untersuchung, welchen Effekt die N- und C-terminale Interaktion auf das Aggregationsverhalten des Wildtyp-AR bzw. der beiden pathologischen AR-Konstrukte ARQ65 und ARQ22dm ausüben würde und ob Melatonin diese Interaktion beeinflussen würde, wurde die N/C-Interaktion des Androgenrezeptors blockiert. Dies wurde erreicht, indem die erste Aminosäure des ²³FQNLF²⁷-Motivs durch Alanin ausgetauscht (F23A) und in die AR-Expressionsplasmide eingebracht wurde, womit COS-7 Zellen anschließend transient transfiziert wurden. Da vorangegangene Ergebnisse die meisten ARQ65-Aggregate nach 30-minütiger DHT-Behandlung aufzeigten, wurde untersucht, welchen Einfluss die Blockierung der N/C-Interaktion auf den Androgenrezeptor ebenfalls nach halbstündiger Hormonbehandlung mit DHT und/oder Melatonin bzw. Ethanol als Kontrolle haben würde.

Nachdem die Zellen fixiert und gefärbt worden waren (s. 3.3.1), wurde die Anzahl der Aggregate-positiven Zellen ermittelt. In 4-8 unabhängigen Versuchen wurden jeweils mind. 100 Zellen „blind“ analysiert.

In Einklang mit den Studien von Orr *et al.* (2010) stellte sich dabei heraus, dass das Hemmen der N/C-Interaktion zur Folge hatte, dass keine einzige Zelle mit makromolekularen Aggregaten beobachtet werden konnte, unabhängig vom exprimierten AR-Konstrukt und der Hormon-Behandlung.

Zur Verifizierung, dass die Mutation des FxxLF-Motivs zu AxxLF (F23A) in den AR-Expressionsplasmiden auch tatsächlich die Interaktion des N- und C-Terminus unterband, wurde eine sog. *Mammalian Two-Hybrid* Interaktionsstudie durchgeführt. Dieses System erlaubte es, die *in vivo* Interaktion zweier Proteine in Säugerzellen zu untersuchen.

Zur Analyse der N/C-Interaktion des ARQ22-, ARQ65- und ARQ22dm-Androgenrezeptors wurden COS-7 Zellen mit folgenden Expressionsplasmiden gleichzeitig transfiziert: (1) Der N-Terminus des AR (Aminosäure 14-565), der die verschieden langen polyQ-Trakte enthielt, gekoppelt an die *Herpes simplex*-Virus Aktivierungsdomäne des VP16-Vektors, (2) der C-Terminus des AR (Aminosäure 624-919), welcher an die GAL4-DNA-Bindedomäne gekoppelt war, (3) ein Gal4-Luziferase-Reporterplasmid und (4) ein *Renilla*-Luziferase-Reporterplasmid zur Normalisierung der Transfektions-Effizienz. Das Prinzip des *Mammalian Two-Hybrid* Systems beruhte darauf, dass viele Transkriptions-Aktivatoren aus zwei physikalisch und funktional verschiedenen Einheiten bestehen (Lee und Lee, 2004). Erst wenn die beiden Proteine, welche jeweils an die Binde- bzw. Transaktivierungsdomäne des Transkriptions-Aktivators (hier: GAL4) banden, miteinander interagierten, konnte GAL4 an die *Upstream Activation Sequence* (UAS) binden und das stromabwärts klonierte Reportergen, hier: Luziferase, wurde aktiviert. Der normalisierte Messwert wurde erhalten, indem das gemessene GAL4-induzierte Luziferase-Signal durch das *Renilla*-Luziferase-Signal dividiert wurde (3.21).

Die Ergebnisse der *Mammalian Two-Hybrid* Studie zeigten, dass die Induktion der N- und C-terminalen Interaktion nach DHT-Behandlung bei ARQ22- und ARQ65-Expression jeweils um das 8-fache anstieg; bei der Expression von ARQ22dm war die DHT-abhängige N/C-Interaktion etwas geringer. Des Weiteren zeigte sich, dass Melatonin, wenn es zusammen mit DHT verabreicht wurde, keinen Einfluss auf die DHT-induzierte N/C-Interaktion nahm und diese Interaktion selbst nicht induzieren konnte. Wurde die

(F23A)-Mutation in die N-terminalen AR-Konstrukte eingebracht, so fand keine N- und C-terminale Interaktion statt (Abb. 3.21).

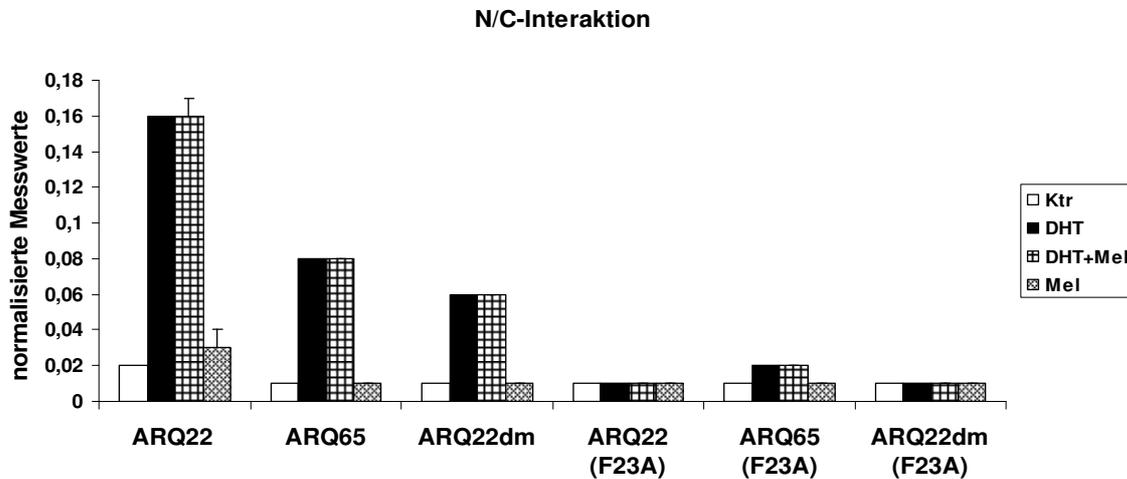


Abb. 3.21 Mammalian Two-Hybrid Studie zur Untersuchung der N/C-Interaktion des AR

1×10^5 COS-7 Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät und transient mit $0,5 \mu\text{g}$ pVP16-ARTAD(Q_x) + $0,2 \mu\text{g}$ hAR LBD GAL4 DBD + $0,8 \mu\text{g}$ pSGΔE4-38-luc + $0,1 \mu\text{g}$ *Renilla*-tk-luc transfiziert. Nach 16-stündiger Behandlung mit Ethanol (Ktr), DHT und/oder Melatonin wurden die Zellen geerntet und die Luziferase-Aktivitäten bestimmt. *Renilla*-Luziferase wurde als interne Transfektionskontrolle zum Normalisieren verwendet. n=1 (Ktr)-2 (Hormone) in Triplikaten, SEM.

Zur Untersuchung, ob die (F23A)-Mutation des FxxLF-Motivs die Expression des Androgenrezeptors beeinflussen würde, wurde diese anhand von Western Blot Analysen überprüft. Die Expression des Androgenrezeptors wurde mithilfe eines AR-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Die Detektion des Haushaltsproteins α -Tubulin diente als Ladekontrolle (Abb. 3.22).

Es zeigte sich, dass die (F23A)-Mutation die Expression der AR-Konstrukte nicht beeinflusste; verglichen mit der Expression von α -Tubulin fand sogar noch eine stärkere Expression der AR (F23A)-Konstrukte statt (Abb. 3.22 A, B). Die Behandlung mit DHT und/oder Melatonin führte zu keinen Unterschieden bezüglich der Expression des Androgenrezeptors im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Bei Abb. 3.22 B schien die ARQ22 (F23A)- und α -Tubulin-Bande nach Kontroll- bzw. Melatonin-Behandlung etwas schwächer zu sein, dies konnte jedoch auf eine Luftblase zurückgeführt werden, sodass die Antikörper-Detektierung hierbei nicht optimal stattgefunden hatte.

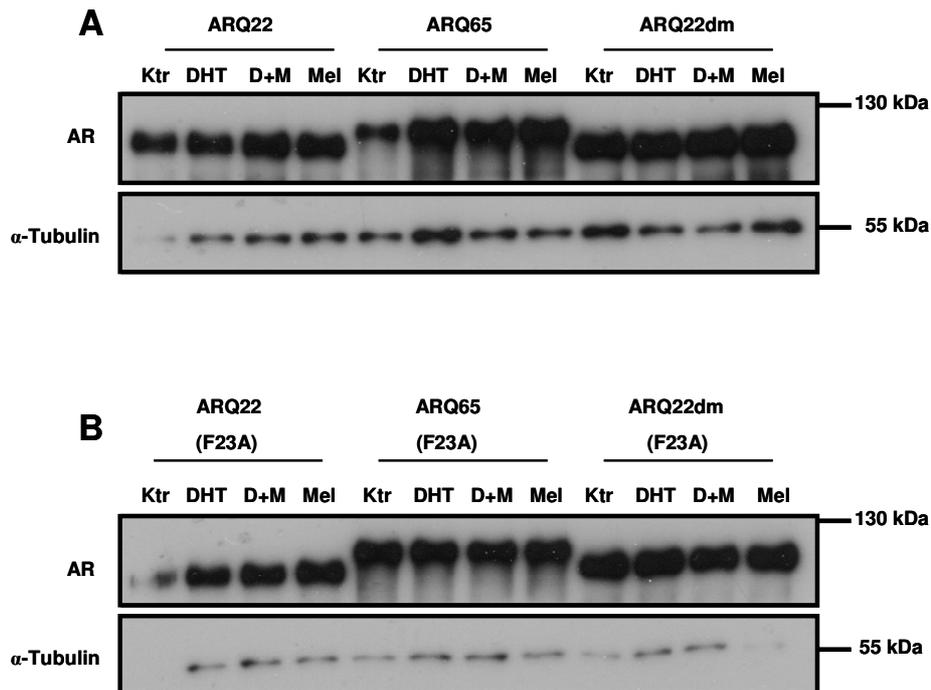


Abb. 3.22 Western Blot Analyse AR-exprimierender COS-7 Zellen

Jeweils 5 μ l der Zelllysate, welche aus 3.26 hervorgingen, wurden mittels eines 10 %-igen Polyacrylamidgels der Größe nach aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Androgenrezeptor wurde anhand des polyklonalen AR (N-20)-Antikörpers nachgewiesen, α -Tubulin diente als Ladekontrolle und wurde anhand eines monoklonalen α -Tubulin-Antikörpers detektiert.

Die Untersuchungen an COS-7 Zellen führten zu dem Ergebnis, dass vor allem der polyQ-erweiterte Androgenrezeptor (ARQ65) in Abhängigkeit von DHT das Vorhandensein makromolekularer Aggregate induzierte. Deren Bildung war abhängig von der N- und C-terminalen Interaktion des Androgenrezeptors, denn das Hemmen dieser Interaktion führte dazu, dass kein einziges Aggregat mehr gebildet werden konnte. Des Weiteren offenbarten die Ergebnisse, dass auch Melatonin die Aggregatbildung vermindern konnte, gleichzeitig zeigten die Studien aber, dass Melatonin diesen Effekt nicht über die N/C-Interaktion des Androgenrezeptors ausübte, denn auf diesen Mechanismus nahm Melatonin keinen Einfluss. Die N/C-Interaktion verhinderte zwar die Aggregatbildung des polyQ-erweiterten Androgenrezeptors, dennoch schien dieser Mechanismus nicht alleine verantwortlich zu sein für die Bildung der makromolekularen Aggregate, denn in einem *Mammalian Two-Hybrid* System konnte kein Unterschied zwischen der N- und C-

terminalen Interaktion des Wildtyp-AR und ARQ65 festgestellt werden, aber der Wildtyp-AR bildete keine DHT-induzierten Aggregate, wie es auch die Arbeitsgruppe um Orr feststellte (Orr *et al.*, 2010).

4 Diskussion

Spinale und bulbäre Muskelatrophie ist eine neurodegenerative Erkrankung, für die es bislang noch keine Heilung gibt. In der Vergangenheit wurden viele Bestrebungen unternommen, um den neurodegenerativen Phänotyp abzuschwächen, und viele davon waren auch in *in vitro* und *in vivo* Modellen zum Teil sehr erfolgreich und konnten z. B. in Zell-Modellen die Toxizität des polyQ-erweiterten AR vermindern oder Neurodegeneration in *Drosophila*- und Maus-Modellen entgegenwirken. Dennoch waren der Durchführbarkeit therapeutischer Anwendungen beim Menschen Grenzen gesetzt, beispielsweise im Hinblick auf Protein-Überexpressionen, wie es in Zell-Modellen für einige Hitzeschockproteine gezeigt werden konnte (Kobayashi *et al.*, 2000, Muchowski *et al.*, 2000, aus Review Bauer und Nukina, 2009), oder die eingesetzten Substanzen waren langfristig zu toxisch für den Organismus und zu unspezifisch, z. B. HDAC-Inhibitoren (Review Ranganathan und Fischbeck, 2010).

Vor Kurzem wurde das Hormon Melatonin in einem *Drosophila*-Modell angewandt und seine Wirkung auf den pathologischen Androgenrezeptor im Zusammenhang mit SBMA untersucht. Die Verabreichung von Melatonin ermöglichte es dabei, die neurodegenerativen Defekte, welche der panneuronal exprimierte Polyglutamin-erweiterte Androgenrezeptor (ARQ77) in AR-transgenen Fliegen verursachte, i. e. motorische Störungen, zu hemmen (Funderburk *et al.*, 2008).

Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte von Melatonin in Bezug auf den mutierten, Liganden-aktivierten Androgenrezeptor in SBMA weiter zu charakterisieren. Dazu wurde ein SBMA *Drosophila*-Modell generiert, welches pathologische und nicht-pathologische AR-Konstrukte ausschließlich in Motorneuronen exprimierte. Als Repräsentant für den nicht-pathologischen AR wurde ein Konstrukt mit dem Wildtyp-Androgenrezeptor mit 22 polyQ eingesetzt (ARQ22) sowie ein Konstrukt mit nur einem Glutaminrest (ARQ1). Für den pathologischen AR wurde ein Konstrukt mit 65 hintereinander folgenden Glutaminresten (ARQ65) verwendet. Darüber hinaus wurde eine Mutante herangezogen, welche zwar eine wildtypische polyQ-Sequenz beinhaltete, jedoch die Phosphoserin-Stellen an Position 424 und 514 durch Alanin ausgetauscht worden waren (ARQ22dm) (Funderburk *et al.*, 2008).

In der hier präsentierten Arbeit offenbarten ARQ65- und ARQ22dm-exprimierende *Drosophila* insbes. signifikante DHT-abhängige Lokomotionsdefizite, wohingegen die Expression des Wildtyp-AR sowie die Expression von ARQ1 keinen SBMA-Phänotyp verursachten. Die Expression der beiden pathologischen AR-Konstrukte ARQ65 und ARQ22dm führte darüber hinaus zu erhöhter Zelltoxizität in kultivierten Insektenzellen, was sich durch signifikant reduzierte Viabilität der Zellen äußerte, und vor allem der polyQ-erweiterte AR induzierte die Formation großer, makromolekularer Aggregate in Säugerzellen. All diese AR-vermittelten Defekte wurden durch gleichzeitiges Vorhandensein von Melatonin abgeschwächt oder gar komplett verhindert.

4.1. Die Expression von ARQ65 und ARQ22dm führt zu lokomotorischen Defekten in AR-transgenen *Drosophila*

Bei SBMA handelt um eine sog. *late onset* Krankheit. Das bedeutet, dass sich die Krankheitssymptome bei SBMA-Patienten erst in mittleren Lebensjahren äußern (Gusella und McDonald, 2000, aus Nestor und Monckton, 2011). Um längerfristige Hormon-abhängige Auswirkungen auf die AR-transgenen *Drosophila* zu untersuchen, wurden Langzeit-Überlebensstudien mit ARQ22- bzw. ARQ65-exprimierenden Fruchtfliegen über einen Zeitraum von 45 Tagen vorgenommen. Derartige Langzeit-Überlebensstudien wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen zur Untersuchung der neurodegenerativen Krankheiten Huntington oder Alzheimer durchgeführt und zeigten eine Huntingtin- oder A β 42-induzierte Verminderung der Überlebensrate (Ling *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009). Die Langzeit-Studien der hier präsentierten Arbeit hingegen führten zu keinem SBMA-Phänotyp; es starben in An- und in Abwesenheit von DHT fast genauso viele ARQ22- bzw. ARQ65-exprimierende *Drosophila*. Dies könnte dadurch zu erklären gewesen sein, dass für die hier verwendete Treiberlinie OK371-GAL4 publiziert wurde, dass das Ziel-Gen nur vom Embryonalstadium bis zum Imago exprimiert wird (Mahr und Aberle, 2005). Es konnte in jungen adulten *Drosophila* zwar die Expression der untersuchten AR-Konstrukte mittels Western Blot Analysen nachgewiesen werden, jedoch wäre es denkbar gewesen, dass die Expression des Androgenrezeptors schon am

Abklingen war und im Laufe des Adultstadiums zunehmend abnahm. Eine andere Erklärung könnte gewesen sein, dass durch das Auswählen von Imagines, welche den kritischen Schritt der Metamorphose, bei welcher sehr viele physiologische Veränderungen vonstatten gehen (Sinadinos *et al.*, 2009), überstanden hatten, eine Art Vorselektion stattgefunden hatte und dadurch nur sehr robuste Fliegen für die Langzeit-Überlebensstudie ausgewählt worden waren.

AR-transgene *Drosophila* wurden des Weiteren verwendet, um die Auswirkungen der Motorneuron-spezifischen Expression der verschiedenen AR-Konstrukte auf die Lokomotionsfähigkeit der Fliegenlarven zu analysieren, denn SBMA zeichnet sich durch den fortschreitenden Verlust sensorischer und motorischer Neuronen aus (Review Kumar *et al.*, 2011), wodurch Schwächungen und Atrophien proximaler Muskeln hervorgerufen werden (Sobue *et al.*, 1989). Dies manifestiert sich was sich letzten Endes in motorischen Störungen bei SBMA-Patienten (Kennedy *et al.*, 1968, Fischbeck, 1997). Für die lokomotorischen Studien wurde in dieser Arbeit der prozentuale Anteil derjenigen AR-transgenen *Drosophila* Larven erfasst, welche sich die Wand des Futtergefäßes hoch bewegten hatten, um sich dort zu verpuppen. Diese Analysen ergaben, dass die Motorneuron-spezifische Expression des Wildtyp-AR sowie ARQ1 zu keinen Defekten führte, wohingegen die Expression von ARQ65 und ARQ22dm signifikante DHT-induzierte lokomotorische Beeinträchtigungen hervorriefen und somit einen pathologischen Phänotyp auslösten. Andere Arbeitsgruppen kamen in Lokomotionsstudien, bei welchen Larven, die den AR panneuronal exprimierten, z. B. in die Mitte einer Petrischale gesetzt und die zurückgelegte Wegstrecke innerhalb einer bestimmten Zeit ermittelt wurde, zu ähnlichen Ergebnissen (Funderburk *et al.*, 2008, Sinadinos *et al.*, 2009). Somit führte sowohl die panneuronale, als auch die Motorneuron-spezifische Expression pathologischer AR-Konstrukte zu vergleichbaren Resultaten; die hier präsentierten Lokomotionsstudien waren geeignet, um einen SBMA-Phänotyp zu ermitteln.

Die *Drosophila*-Studien dieser Arbeit führten des Weiteren zu dem Ergebnis, dass nicht nur der polyQ-erweiterte Androgenrezeptor (ARQ65) einen neurodegenerativen Phänotyp hervorrief, sondern auch ein AR-Konstrukt, welches einen wildtypischen polyQ-Trakt beinhaltete, welcher jedoch zwei Aminosäure-Mutationen in flankierenden Sequenzen aufwies (ARQ22dm). Einige Studien belegten bereits, dass nicht nur der

polyQ-Trakt selbst, sondern der gesamte Proteinkontext einen Einfluss auf die Funktion und Toxizität von polyQ-Proteinen nahmen (Nozaki *et al.*, 2001, LaFevre-Bernt und Ellerby, 2003, La Spada und Taylor, 2003, Bulone *et al.*, 2006, Menon und Pastore, 2006). Für eine Einbindung von Sequenzen außerhalb des polyQ-Traktes spricht auch die Tatsache, dass SBMA-Symptome am präzisesten induziert werden konnten, wenn transgene Tiere nicht nur ein N-terminales Fragment, sondern das gesamte AR-Protein exprimierten (Chevalier-Larsen *et al.*, 2004, Sopher *et al.*, 2004, aus Nedelsky *et al.*, 2010).

Funderburk und Kollegen exprimierten ARQ22dm in *Drosophila* sowohl spezifisch im Auge als auch panneuronal, was jeweils Neurodegeneration hervorrief. Dies zeichnete sich durch Deformation der Einzelaugen aus und verursachte damit einen sog. raue Augen-Phänotyp. Die panneuronale Expression führte zu lokomotorischen Störungen dahingehend, dass die AR-transgenen *Drosophila* Larven sich sowohl langsamer, als auch weniger geradlinig bewegten und sich mehr um ihre eigene Achse wanden anstatt sich vorwärts zu bewegen (Funderburk *et al.*, 2008). Palazzolo *et al.* (2007) zeigten, dass die Substitution zweier Akt-Phosphorylierungsstellen (Lin *et al.*, 2001) im ARQ65, Serin 215 und Serin 792, durch Aspartat, wodurch konstitutive Phosphorylierung nachgeahmt wurde, zu verminderter DHT-abhängiger Toxizität, i. e. erhöhter Zellviabilität im Vergleich zu ARQ65 ohne diese Mutation führte.

Nicht nur Phosphorylierungen, sondern beispielsweise auch Acetylierungen des AR wurden mit SBMA in Verbindung gebracht. Die Arbeitsgruppen um Thomas und Montie fanden jeweils heraus, dass die Deacetylierung zweier Lysinreste, die im Wildtyp-Androgenrezeptor (ARQ24) in Liganden-abhängiger Weise acetyliert werden (Lin *et al.*, 2001), Fehlfaltung und Aggregation des ARQ24-Proteins verursachte, wie sie auch beim polyQ-expandierten Androgenrezeptor (ARQ112) in Erscheinung traten (Thomas *et al.*, 2004). Des Weiteren reduzierte die Deacetylierung des polyQ-erweiterten AR die Bildung von Aggregaten wesentlich (Montie *et al.*, 2011).

4.2 Die Morphologie der neuromuskulären Innervierung ARQ65- und ARQ22dm-exprimierender *Drosophila* ist verändert

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die neuromuskuläre Innervierung AR-transgener *Drosophila* (ARQ1, ARQ22, ARQ65 und ARQ65) im vierten abdominalen Muskelpaar 6/7, welches von zwei individuellen Neuronen innerviert wird (Hoang und Chiba, 2001), untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der neuronalen Verzweigungen bei ARQ65- und ARQ22dm-exprimierenden Larven in DHT-abhängiger Weise signifikant reduziert war, wohingegen die Anzahl der Boutons keine Veränderungen erkennen ließ und die Expression des Wildtyp-AR sowie die Expression von ARQ1 zu keinen neurodegenerativen Defekten führte. Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls die neuromuskuläre Innervierung des polyQ-expandierten AR (ARQ52) in der hier verwendeten Treiberlinie (OK371-GAL4). Im Vergleich zur hier vorgestellten Studie analysierten Nedelsky *et al.* (2010) Muskel 4 in den Abdominalsegmenten 2-5, welcher dorsal gelegen ist und von drei verschiedenen Neuronen innerviert wird (Hoang und Chiba, 2001). In der *Drosophila* Larve wird jedes sog. Hemisegment von jeweils 30 Muskeln innerviert (Lnenicka *et al.*, 2006), deren neuronale Innervierung in den Abdominalsegmenten 2-7 sehr stereotyp verläuft (Choi *et al.*, 2004). Welche Muskeln im Detail Lokomotion vermitteln, ist nicht bekannt.

Nedelsky und Mitarbeiter fanden im Gegensatz zur hier präsentierten Arbeit eine DHT-abhängige Verminderung der Typ Ib Boutons (Nedelsky *et al.*, 2010). Da Muskel 4 bzw. das Muskelpaar 6/7 jeweils von unterschiedlichen Neuronen innerviert wurden, konnten die Ergebnisse die Boutons betreffend nicht verglichen werden. Dennoch könnte sowohl die reduzierte Anzahl an Typ Ib Boutons von Nedelsky und Mitarbeitern als auch die hier präsentierte Verminderung der neuronalen Verzweigungen letzten Endes über die selben Mechanismen zu lokomotorischen Defekten geführt haben, beispielsweise durch eine Reduktion der Neurotransmitter-Freigabe. Bei Nedelsky *et al.* (2010) könnte durch die signifikant verminderte Bouton-Zahl *per se* weniger Neurotransmitter vorhanden gewesen und übermittelt worden sein. In der hier präsentierten Arbeit könnten die Androgen-anhängigen lokomotorischen Defekte der ARQ65- und ARQ22dm-transgenen Fliegenlarven dadurch zu erklären gewesen sein, dass durch die gleichbleibende Anzahl an Boutons und die verminderte Anzahl an neuronalen Verzweigungen mehr Boutons auf

weniger Neuronen-Fläche untergebracht werden mussten. Durch die mitunter enge Aneinanderlagerung der Boutons könnte weniger Neurotransmitter entlassen worden sein, was die lokomotorischen Störungen verursacht haben könnte. Dies müssen jedoch weitere Studien klären. Die Unterdrückung der Neurotransmitter-Freigabe führte in den Analysen von Suster und Bates ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die peristaltischen Bewegungen der untersuchten *Drosophila* Larven ausblieben und sich somit lokomotorische Defekte offenbarten (Suster und Bate, 2002).

4.3 Die Expression der pathologischen AR-Konstrukte reduziert die Zellviabilität

In dieser Arbeit wurde sowohl der Wildtyp-AR (ARQ22) als auch der polyQ-erweiterte AR (ARQ65) mithilfe des Baculovirus-Systems in Sf9 Insektenzellen exprimiert. Die Hormon-abhängige Viabilität der Zellen wurde mittels Celltiter Blue® ermittelt, wobei die metabolische Aktivität lebender Zellen erfasst wurde. Dies führte zu dem Ergebnis, dass die Expression des Wildtyp-AR keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen nahm. Ganz anders ergab es sich, wenn die Zellen ARQ65 exprimierten. Hierbei war eine signifikante, DHT-induzierte Toxizität zu verzeichnen, was sich in verminderter Zellviabilität äußerte. Dies entsprach den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass der AR mit einer polyQ-Expansion zu erhöhter Toxizität und damit einhergehend zu vermindertem Überleben der Zellen führte (Ikeda *et al.*, 1996, Igarashi *et al.*, 1998, Martindale *et al.*, 1998, aus Grierson *et al.*, 2001; Welch und Diamond, 2001, Thomas *et al.*, 2005, Palazzolo *et al.*, 2007).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal die Viabilität von Zellen, welche den Wildtyp-AR mit zwei mutierten Phosphoserin-Stellen (ARQ22dm) exprimierten, untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Doppelmutation im Wildtyp-AR in gleichem Maße wie die Expansion des polyQ-Traktes im AR zu signifikant vermindertem Überleben der Zellen führte und damit nicht nur im *Drosophila*-System, sondern auch in kultivierten Insektenzellen Toxizität auslöste.

Welche zellulären Mechanismen zu reduzierter Viabilität der Zellen führten, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Andere Arbeitsgruppen haben jedoch bereits gezeigt, dass sowohl Apoptose (Igarashi *et al.*, 1998, Saudou *et al.*, 1998, Ellerby *et al.*, 1999, aus Grierson *et al.*, 2001) als auch Autophagie (Montie *et al.*, 2009a, b, Rusmini *et al.*, 2010, 2011) Zellsterben polyQ-AR-exprimierender Zellen einleitete.

4.4 Die Expression von ARQ65 führt zur Formation makromolekularer Aggregate

Das Vorhandensein von makromolekularen AR-Aggregaten ist ein klares Zeichen von SBMA (Review Kumar *et al.*, 2011). Solche Aggregate wurden sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma in untersuchten Geweben von SBMA-Patienten gefunden (Adachi *et al.*, 2005). Diese Aggregate beinhalten polyQ-Fragmente und entstehen durch proteolytischen Abbau (Li *et al.*, 1998; Palazzolo *et al.*, 2008, Kerkhofs *et al.*, 2009, aus Review Kumar *et al.*, 2011), weil das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) nicht mehr in der Lage ist, die polyQ-erweiterten Regionen in den Proteinen vollständig zu beseitigen (Holmberg *et al.*, 2004, aus Rusmini *et al.*, 2010). Somit scheint die Polyglutamin-Erweiterung seine eigene Proteolyse zu verhindern, indem vorgefertigte polyQ-Aggregate vor Degradierung über das UPS geschützt werden (Verhoef *et al.*, 2002, aus Palazzolo *et al.*, 2007).

In publizierten Studien wurde gezeigt, dass zwar eine Korrelation zwischen der Ausbildung makromolekularer Aggregate und Toxizität bestand, sodass bislang nicht eindeutig geklärt ist, ob die unter dem Lichtmikroskop sichtbaren Aggregate tatsächlich die Toxizität des Androgenrezeptors vermitteln oder nicht (Adachi *et al.*, 2007a, Li *et al.*, 2007, aus Review Ranganathan und Fischbeck, 2010). Allerdings wird mehr und mehr vermutet, dass diese unter dem Lichtmikroskop sichtbaren AR-Proteinaggregate eher eine protektive und nicht eine toxische Wirkung auf die Zelle innehaben, sondern vielmehr Zwischenprodukte – nanomolekulare oligomere Spezies wie Präfibrillen, Fibrillen (Palazzolo *et al.*, 2008; Lansbury und Lashuel, 2006, Haass und Selkoe, 2007, aus

Review Hirth, 2010) und sog. Mikroaggregate (Arrasate *et al.*, 2004, aus Review Bauer und Nukina, 2009) – auf dem Weg vom nativen polyQ-Protein zum toxischen Aggregat (Perutz *et al.*, 1994, De Luchi *et al.*, 2003, Takahashi *et al.*, 2008) die Krankheitsauslösende Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurden COS-7 Säugerzellen nach ARQ22-, ARQ65- und ARQ22dm-Expression unter dem Lichtmikroskop analysiert und dabei makromolekulare Aggregate beobachtet. Diese Aggregate wurden insbes. in ARQ65-exprimierenden Zellen in DHT-abhängiger Weise im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen. Zellen, die den Wildtyp-AR exprimierten, bildeten praktisch keine Aggregate und die Expression des ARQ22dm führte zwar zu einer tendenziellen Aggregatbildung, diese war jedoch statistisch nicht signifikant. Ehemalige Labormitglieder kamen in ihren Studien zu dem Ergebnis, dass ARQ22dm vermehrt Aggregate ausbildete (Funderburk *et al.*, 2008), diese Unterschiede konnten jedoch durch unterschiedliche Definitionen der analysierten Aggregate des AR erklärt werden, denn die von Funderburk und Kollegen untersuchten Aggregate waren deutlich kleiner und diffuser.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden nur Zellen, welche individuell erkennbare, makromolekulare Inklusionen mit mindestens ca. 1 μm Größe aufwiesen, als Aggregate-positive Zellen definiert und ausgewertet. Die Inklusionen hatten dabei in Anwesenheit von DHT anfänglich einen Durchmesser von ungefähr 1 μm und schienen eine globuläre Morphologie aufzuweisen, wohingegen die mehrstündige Hormonbehandlung dazu führte, dass die zytoplasmatischen Inklusionen einen Durchmesser von mehr als 2 μm erreichten und eine annuläre Form annahmen. Die Größe der hierbei gefundenen Aggregate stimmte überein mit den von Sinadinos und Kollegen beobachteten Huntingtin-Aggregaten in einem Huntington-*Drosophila*-Modell, welches polyQ-expandiertes Huntingtin-Protein in Motoneuronen exprimierte (Sinadinos *et al.*, 2009). Die Aggregate in den Axonen der Fruchtfliegen hatten einen Durchmesser von 1-2 μm und konnten sowohl eine globuläre, als auch eine annuläre Form annehmen, wobei mehr globuläre Aggregate gefunden worden waren.

Eine weitere Studie belegte, dass die Transfektion primärer Rattenneuronen mit Q80-Fusionsproteinen zu intrazellulären makromolekularen Aggregaten führte, welche ebenfalls etwa 2,5 μm groß waren (Moulder *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit rief sowohl ARQ65- als auch ARQ22dm-Expression in einem SBMA-*Drosophila*-Modell in DHT-abhängiger Weise signifikante Defekte hervor. Zudem verminderten beide AR-Konstrukte in kultivierten Insektenzellen deren Viabilität signifikant, in Säugerzellen wurden allerdings nur makromolekulare Aggregate gefunden, wenn die Zellen ARQ65, nicht jedoch ARQ22dm exprimierten. Aus diesen Gründen konnte angenommen werden, dass diese großen Aggregate eher anderer Natur waren und nicht *per se* Toxizität vermittelten, sondern vielmehr kleinere, unter dem Lichtmikroskop nicht sichtbare Aggregate die toxische Funktion der pathologischen AR-Konstrukte ausübten. Auch Sinadinos *et al.* (2009) kamen in ihren Studien zu dem Ergebnis, dass zytoplasmatische Aggregate nicht direkt für die Liganden-induzierte Neurotoxizität des polyQ-erweiterten Androgenrezeptors verantwortlich zu sein schienen (aus Rusmini *et al.*, 2010).

Die Annahme, dass die kleineren Aggregate diejenigen sind, welche Toxizität vermitteln, wurde unterstützt durch die Ergebnisse, welche ein ehemaliges Labormitglied in seiner Doktorarbeit erlangte. Dr. Tobias Jochum exprimierte ARQ1, ARQ22, ARQ65 und ARQ22dm mithilfe des Baculovirus-Systems und reinigte den AR jeweils nach DHT-Behandlung auf. Anhand von *Atomic Force Microscopy* (AFM) konnte Dr. Tobias Jochum zeigen, dass ARQ65 und ARQ22dm dieselben oligomeren fibrillären Strukturen bildeten. Diese wiesen jeweils eine Länge von 300-600 nm auf und waren damit deutlich kleiner als die in der hier vorgelegten Arbeit gefundenen Aggregate. Die von Dr. Tobias Jochum gefundenen Strukturen zeichneten sich des Weiteren deutlich von jenen ab, welche der Wildtyp-AR und ARQ1 bildeten: In Anwesenheit des AR-Liganden formten diese annuläre Strukturen, welche einen Durchmesser von maximal 200 nm erreichten (unveröffentlicht).

4.5 Die Blockierung der N/C-terminalen AR-Interaktion verhindert die Ausbildung makromolekularer AR-Aggregate

Auch wenn die bei SBMA gefundenen Aggregate nicht toxischer Natur zu sein scheinen, so konnte dennoch auch gezeigt werden, dass die Tendenz des mutierten Proteins, zu aggregieren, mit seiner Toxizität korrelierte (Adachi *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2007, aus Review Ranganathan und Fischbeck, 2010).

Bei der Bildung von AR-Aggregaten spielt vor allem die N- und C-terminale Interaktion des AR eine wichtige Rolle (He *et al.*, 1999, Orr *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde die N/C-Interaktion durch Mutagenese blockiert und die Aggregatbildung in ARQ22-, ARQ65- und ARQ22dm-exprimierenden COS-7 Säugerzellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass durch die gehemmte N/C-Interaktion keinerlei makromolekulare AR-Aggregate mehr zu beobachten waren, unabhängig vom exprimierten AR-Konstrukt.

Orr und Kollegen publizierten ebenfalls, dass das Blockieren der N/C-Interaktion die Anzahl an Aggregaten in kultivierten ARQ112-exprimierenden Zellen *in vitro* verminderte (Orr *et al.*, 2010). Nedelsky und Mitarbeiter beobachteten darüber hinaus, dass das Hemmen der N- und C-terminalen Interaktion des AR *in vivo* in verschiedenen Geweben AR-transgener *Drosophila* dazu führte, dass der ARQ52-induzierte Phänotyp in Anwesenheit von DHT stark vermindert war (Nedelsky *et al.*, 2010).

Die Mechanismen, über welche das Blockieren der N- und C-terminalen Interaktion des Androgenrezeptors die Aggregatbildung und Zelltoxizität verbesserte bzw. komplett verhinderte, wie es die hier vorgestellte Arbeit sowie die Studien der Arbeitsgruppe um Orr zeigten, müssen in zukünftigen Studien untersucht werden. Orr *et al.* (2010) fanden neben makromolekulare Aggregatbildung auch ARQ112-induzierte Toxizität, i. e. vermehrtes Zellsterben, in kultivierten Zellen. Beides konnte durch das Hemmen der N/C-Interaktion vermindert werden. Angenommen, dass nicht die unter dem Lichtmikroskop sichtbaren Aggregate, sondern vielmehr Zwischenprodukte im nanomolekularen Bereich die Toxizität von polyQ-Proteinen vermittelte, könnten diese Ergebnisse zusammengekommen ebenfalls darauf schließen lassen, dass durch das Blockieren der N/C-Interaktion nicht nur die Bildung großer, mutmaßlich protektiver,

sondern auch die Bildung kleiner, toxischer AR-Aggregate unterbunden wurde, was sich in erhöhter Zellviabilität äußerte.

4.6 Melatonin hemmt den DHT-abhängigen SBMA-Phänotyp

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Melatonin in experimentellen Modellen von SBMA die DHT-induzierte Toxizität, welche die Expression von ARQ65 und ARQ22dm hervorrief, abmilderte. Im *Drosophila*-Modell wirkte die Verabreichung von Melatonin den neurodegenerativen Defekten ARQ65- und ARQ22dm-exprimierender Fliegen entgegen. In Sf9 Insektenzellen brachte Melatonin die DHT-induzierte verminderte Viabilität ARQ65- und ARQ22dm-exprimierender Zellen wieder auf Kontrollniveau. In COS-7 Säugerzellen reduzierte Melatonin signifikant die Anzahl makromolekularer Aggregate.

Die Aggregatbildung ist ein dynamischer Prozess, der über Zwischenstufen verläuft, bis schließlich das große Aggregat unter dem Lichtmikroskop in Erscheinung tritt. Es wurde bereits erwähnt, dass nicht makromolekulare Aggregate, sondern Zwischenstufen auf dem Weg vom nativen zum aggregierten Protein die polyQ-Toxizität zu vermitteln scheinen (Arrasate *et al.*, 2004, aus Review Bauer und Nukina, 2009).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ARQ65-Expression zur Bildung großer Aggregate führte. Deren Formation konnte durch gleichzeitige Behandlung mit Melatonin signifikant unterdrückt werden. Auch die Blockierung der N- und C-terminalen Interaktion des Androgenrezeptors konnte in diesen Studien die Bildung makromolekularer Aggregate gänzlich unterbinden. Die Ergebnisse dieser Arbeit schlossen jedoch aus, dass Melatonin Aggregatbildung und Toxizität pathologischer AR-Konstrukte über den Mechanismus der N/C-Interaktion verhinderte, da Melatonin die native N- und C-terminale Interaktion nicht zu hemmen vermochte.

Nicht nur auf makromolekulare, wie in dieser Arbeit gezeigt, sondern auch auf nanomolekulare Aggregate nahm Melatonin Einfluss. Dr. Tobias Jochum präsentierte unlängst in seiner Doktorarbeit, dass Melatonin die Morphologie des pathologischen AR,

welcher mithilfe des Baculovirus-Systems exprimiert, aufgereinigt und anhand von AFM untersucht wurde, dahingehend beeinflusste, dass das Hormon den DHT-abhängigen fibrillären Phänotyp in eine annuläre Struktur umwandeln konnte, sodass ARQ65 und ARQ2dm vom Wildtyp-AR nicht mehr zu unterscheiden waren (unveröffentlicht). Diese Ergebnisse untermauerten, dass oligomere Zwischenstufen zur Toxizität pathologischer AR-Proteine führten und präsentierten gleichzeitig einen Hinweis, wie die *Rescue*-Effekte von Melatonin zu erklären sein könnten, nämlich über die Bildung annulärer Strukturen, welche nicht toxisch zu sein scheinen. Diese Resultate lieferten jedoch keine Erklärung über die mechanistischen Wirkungen von Melatonin auf den pathologischen AR.

Da Melatonin den DHT-induzierten Phänotyp abschwächen konnte, stellte sich die Frage, ob Melatonin am selben Ort wie DHT, über die Liganden-Bindedomäne, auf den Androgenrezeptor wirkte. Eine Hormon-Bindestudie führte in dieser Arbeit allerdings zu dem Ergebnis, dass Melatonin nicht an die Liganden-Bindedomäne des AR band. Studien von anderen Arbeitsgruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen: Hormon-Bindestudien mit radioaktiv markiertem Mibolerone, einem künstlichen AR-Agonist, ergaben in (stabil AR-transfizierten) Prostatakrebs-Zelllinien, dass Melatonin keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften von DHT auf den AR nahm (Rimler *et al.*, 2001, 2002).

Eine direkte Bindung von Melatonin an die Liganden-Bindedomäne des AR konnte zwar ausgeschlossen werden, dennoch wäre es denkbar, dass Melatonin direkt über andere Domänen an den AR band oder indirekt auf den AR wirkte. Eine direkte Wirkung von Melatonin könnte beispielsweise über Interkalation mit dem AR erfolgt sein: Es wurde mehrfach beschrieben, dass die Bildung eines polyQ-Aggregats in mehreren Schritten erfolgte, wobei sich polyQ-Proteine aneinander anlagerten und Oligomere und lösliche Zwischenstufen bildeten, welche in Protofibrillen und schließlich in Fibrillen übergingen, ähnlich, wie auch β -amyloide Strukturen gebildet werden (Ross, 2002, Ross and Poirier, 2004, von Mikecz, 2009, aus Rusmini *et al.*, 2010). Auch für den polyQ-erweiterten AR wurde beschrieben, dass dieser eine amyloide Struktur annehmen konnte (Ross und Poirier, 2004). Somit könnte eine Möglichkeit, wie Melatonin Einfluss auf die Funktion des Androgenrezeptors genommen haben könnte, sein, dass Melatonin die Sekundärstruktur des AR modifizierte, wie es in einem Alzheimer-Modell mit dem

A β 1-40 Peptid gezeigt wurde, wobei Melatonin strukturell mit dem Peptid zu interagieren schien und dabei die Ausbildung amyloider Fibrillen verhinderte (Pappolla *et al.*, 1998).

Des Weiteren wäre denkbar, dass Melatonin indirekt über andere Moleküle auf den AR Einfluss nahm. Ein Kandidat hierfür wäre z. B. Calmodulin (CaM). Eine indirekte Wirkung von Melatonin über Calmodulin (CaM) wurde bereits für einen anderen Steroid-Hormon-Rezeptor, den Östrogenrezeptor (ER), beschrieben (Castoria *et al.*, 1988): Melatonin leitete eine Konformationsänderung im ER α /CaM-Komplex ein, was die ER α -abhängige Transkription unterband (del Río *et al.*, 2004). In LNCaP Zellen wurde gezeigt, dass die Bindung des AR an CaM diesen vor proteolytischem Abbau schützte (Sivanandam *et al.*, 2011).

Der richtige Abbau des Androgenrezeptors spielt bei SBMA eine wichtige Rolle. Viele polyQ-Proteine, darunter auch der Androgenrezeptor, werden mit proteolytischem Abbau in Verbindung gebracht, wobei toxische, polyQ-beinhaltende Proteine durch unvollständigen Abbau entstehen (Palazzolo *et al.*, 2008, Kerkhofs *et al.*, 2009, aus Review Kumar *et al.*, 2011; Review Bauer und Nukina, 2009), sodass Melatonin etwa über Calmodulin pathologische AR-Konstrukte vor dem proteolytischen Abbau schützte und dadurch die Bildung toxischer Oligomere verhinderte, was es noch zu überprüfen gilt.

Eine weitere indirekte Wirkung von Melatonin auf den AR könnte durch Phosphorylierung des AR erfolgt sein. Die Liganden-abhängige Aktivierung des Androgenrezeptors geht mit spezifischen post-translationalen Modifikationen, vor allem Phosphorylierungen, einher, welche durch Anwesenheit eines amplifizierten polyQ-Traktes verändert sind und für die Fehlfaltung und Toxizität des AR verantwortlich gemacht werden (LaFevre-Bernt und Ellerby, 2003, aus Palazzolo *et al.*, 2008). Jennifer Illgen kam in ihrer Masterarbeit, die sie jüngst in unserer Arbeitsgruppe absolvierte, zu dem Resultat, dass Melatonin wie auch DHT die Phosphorylierung der Androgen-abhängigen Phosphorylierungsstellen Serin 308 (Zhu *et al.*, 2001, Gioeli *et al.*, 2002, Zong *et al.*, 2007) und Serin 210/213 (Gioeli und Paschal, 2011) induzierte (unveröffentlicht). Hierbei beobachtete Jennifer Illgen, dass insbes. in ARQ65- und ARQ22dm-exprimierenden Zellen eine Phosphorylierung von Serin 210/213 im AR durch Melatonin

erfolgte, wohingegen keine Melatonin-induzierte Phosphorylierung im Wildtyp-AR (ARQ22) stattfand.

Andere Studien zeigten ebenso, dass die Phosphorylierung des Androgenrezeptors durch die Serin/Threonin-Kinase Akt an den Akt-Konsensusstellen Serin 215 und Serin 792 (Review Gioeli und Paschal, 2011) eine wichtige Funktion bei SBMA ausübte (Palazzolo *et al.*, 2007). Akt wird stromabwärts von der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert, welches wiederum von IGF-1 aktiviert wird (Palazzolo *et al.*, 2007). Die Arbeitsgruppe um Palazzolo publizierte, dass Akt-Phosphorylierung im polyQ-erweiterten Androgenrezeptor (ARQ65) Toxizität verminderte und die Viabilität der Zellen erhöhte (Palazzolo *et al.*, 2007). Dieselben Effekte konnten durch IGF-1-Stimulation hervorgerufen werden: In einem transgenen SBMA Maus-Modell, welches eine Muskel-spezifische Isoform von IGF-1 überexprimierte, konnte verstärkte Akt-Aktivierung und AR-Phosphorylierung einhergehend mit verminderter Aggregation beobachtet werden (Palazzolo *et al.*, 2009). Somit wäre es denkbar, dass Melatonin auf die Akt-vermittelte Phosphorylierung an Position 210/213 bzw. 215 des pathologischen AR Einfluss nahm, wobei es sich nach Gioeli und Paschal (2011) um ein und dieselbe Phosphorylierungsstelle handelt. Auch in anderen Systemen, beispielsweise in kultivierten Rattenzellen, wurde bereits gezeigt, dass Melatonin die Phosphorylierung von Akt erhöhte (Lee *et al.*, 2006, Kong *et al.*, 2008), was eine Schlüsselrolle bei der neuroprotektiven Funktion von Melatonin zu spielen schien (Kong *et al.*, 2008).

Die Studien dieser Arbeit zeigen, dass Melatonin in experimentellen Modellen von SBMA in die toxischen Wirkungen pathologischer AR-Proteine intervenierte. Diese Arbeit schloss aus, dass Melatonin die protektive Wirkung von Melatonin durch Bindung an die Liganden-Bindedomäne des AR erfolgte, noch griff Melatonin in den Mechanismus der N- und C-terminalen Interaktion des AR ein. Über welche Mechanismen Melatonin die hier präsentierten *Rescue*-Effekte ausübte, müssen weitere Studien klären.

5 Literatur

- Abel A**, Walcott J, Woods J, Duda J, Merry DE (2001). Expression of expanded repeat androgen receptor produces neurologic disease in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 10:107-116.
- Acuña-Castroviejo D**, Escames G, Rodriguez MI, Lopez LC (2007). Melatonin role in the mitochondrial function. *Front.Biosci.*, 12,947–963.
- Adachi H**, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G (2005). Widespread nuclear and cytoplasmic accumulation of mutant androgen receptor in SBMA patients. *Brain* 128:659–670.
- Adachi H**, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Do J, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G (2001). Transgenic mice with an expanded CAG repeat controlled by the human AR promoter show polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction without neuronal cell death. *Hum Mol Genet.*, 10(10):1039-48.
- Adachi H**, Waza M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G (2007a). Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 33(2):135-51. Review.
- Adachi H**, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G (2007b). CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. *J Neurosci.*, 27(19):5115-26.
- Ambegaokar SS**, Roy B, Jackson GR (2010). Neurodegenerative models in Drosophila: polyglutamine disorders, Parkinson disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.*, 40(1):29-39. Review.
- Angaut-Petit D**, Toth P, Rogero O, Faille L, Tejedor FJ, Ferrús A (1998). Enhanced neurotransmitter release is associated with reduction of neuronal branching in a Drosophila mutant overexpressing frequenin. *Eur J Neurosci.*, 10(2):423-34.
- Arbizu T**, Santamaria J, Gomez JM, Quilez A, Serra JP (1983). A family with adult spinal and bulbar muscular atrophy, X-linked inheritance and associated testicular failure. *J Neurol Sci* 59:371-382.
- Armstrong SM**, Cassone VM, Chesworth MJ, Redman JR, Short RV (1986). Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J. Neural Transm. Suppl.*, 21, 375–394.

- Arrasate M**, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431(7010):805-10.
- Atsuta N**, Watanabe H, Ito M, Banno H, Suzuki K, Katsuno M, Tanaka F, Tamakoshi A, Sobue G (2006). Natural history of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): a study of 223 Japanese patients. *Brain* 129:1446–1455.
- Atwood HL**, Govind CK, Wu CF (1993). Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *J Neurobiol* 24:1008-1024.
- Banno H**, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, Sobue G (2009a). Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol.*, 65(2):140-50.
- Banno H**, Katsuno M, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G (2009b). Neuropathology and therapeutic intervention in spinal and bulbar muscular atrophy. *Int J Mol Sci.*, 10(3):1000-12.
- Bauer PO**, Nukina N (2009). The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem.*, 110(6):1737-65. Review.
- Becker M**, Martin E, Schneikert J, Krug HF, Cato AC (2000). Cytoplasmic localization and the choice of ligand determine aggregate formation by androgen receptor with amplified polyglutamine stretch. *J Cell Biol.*, 149(2):255-62.
- Beilin J**, Ball EM, Favaloro JM, Zajac JD (2000). Effect of the **androgen receptor** CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non prostate cell lines. *J Mol Endocrinol.*, 25(1):85-96.
- Beitel LK**, Sabbaghian N, Alarifi A, Alvarado C, Pinsky L, Trifiro M (1995). Characterization of normal and point-mutated human androgen receptors expressed in the baculovirus system. *J Mol Endocrinol.*, 15(2):117-28.
- Benton CS**, de Silva R, Rutledge SL, Bohlega S, Ashizawa T, Zoghbi HY (1998). Molecular and clinical studies in SCA-7 define a broad clinical spectrum and the infantile phenotype. *Neurology*, 51(4):1081-6.
- Bevivino AE**, Loll PJ (2001). An expanded glutamine repeat destabilizes native ataxin-3 structure and mediates formation of parallel beta -fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(21):11955-60.
- Bichara M**, Wagner J, Lambert IB (2006). Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria. *Mutat Res.*, 598(1-2):144-63.

- Bingham** PM, Scott MO, Wang S, McPhaul MJ, Wilson EM, Garbern JY, Merry DE, Fischbeck KH (1995). Stability of an expanded trinucleotide repeat in the androgen receptor gene in transgenic mice. *Nat Genet* 9:191-196.
- Bohen** SP, Kralli A, Yamamoto KR (1995). Hold 'em and fold 'em: chaperones and signal transducers. *Science* 268:1303-1304.
- Boutillier** AL, Rouaux C, Panteleeva I, Loeffler J-P (2007). Chromatin acetylation status in the manifestation of neurodegenerative diseases: HDAC inhibitors as therapeutic tools. *Subcell. Biochem.*, pp. 263–293.
- Bradford** MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brand** AH, Perrimon N (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Brook** JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H et al. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 69:385.
- Brooks** BP, Fischbeck KH (1995). Spinal and bulbar muscular atrophy: a trinucleotide-repeat expansion neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.*, 18(10):459-61.
- Brooks** BP, Merry DE, Paulson HL, Lieberman AP, Kolson DL, Fischbeck KH (1998). A cell culture model for androgen effects in motoneurons. *J. Neurochem.*, 70:1054–1060.
- Brooks** BP, Paulson HL, Merry DE, Salazar-Gruesso EF, Brinkmann AO, Wilson EM, Fischbeck KH (1997). Characterization of an expanded glutamine repeat androgen receptor in a neuronal cell culture system. *Neurobiol Disease* 4:313-323.
- Brown** CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, Willard HF (1989). Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 44:264-269.
- Browning** C, Beresford I, Fraser N, Giles H (2000). Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors. *Br J Pharmacol.*, (5):877-86.
- Bulone** D, Masino L, Thomas DJ, San Biagio PL, Pastore A (2006). The interplay between PolyQ and protein context delays aggregation by forming a reservoir of protofibrils. *PLoS*, 27;1:e111.
- Butler** R, Leigh PN, McPhaul MJ, Gallo JM (1998). Truncated forms of the androgen receptor are associated with polyglutamine expansion in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurobiol* 34:135-150.

- Campuzano V**, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Cañizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, De Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271:1423–1427.
- Caplan AJ**, Langley E, Wilson EM, Vidal J (1995). Hormone-dependent transactivation by the human androgen receptor is regulated by a dnaJ protein. *J Biol Chem* 270:5251-5257.
- Caplen NJ**, Taylor JP, Statham VS, Tanaka F, Fire A, Morgan RA (2002). Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum Mol Genet.*, 11(2):175-84.
- Castoria G**, Migliaccio N, Nola E & Auricchio F (1988). *In vitro* interaction of estradiol receptor with Ca²⁺-calmodulin. *Molecular Endocrinology*, 2:167–174.
- Chai Y**, Koppenhafer SL, Bonini NM, Paulson HL (1999). Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci.*, 19(23):10338-47.
- Chamberlain NL**, Driver ED, Miesfeld RL (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.*, 22(15):3181-6.
- Chan HY**, Warrick JM, Andriola I, Merry D, Bonini NM (2002). Genetic modulation of polyglutamine toxicity by protein conjugation pathways in *Drosophila*. *Hum Mol Genet.*, 11(23):2895-904.
- Chang C**, Wang C, DeLuca HF, Ross TK, Shih CC (1992). Characterization of human androgen receptor overexpressed in the baculovirus system. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89(13):5946-50.
- Chevalier-Larsen ES**, O'Brien CJ, Wang H, Jenkins SC, Holder L, Lieberman AP, Merry DE (2004). Castration restores function and neurofilament alterations of aged symptomatic males in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurosci* 24:4778–4786.
- Choi JC**, Park D, Griffith LC (2004). Electrophysiological and morphological characterization of identified motor neurons in the *Drosophila* third instar larva central nervous system. *J Neurophysiol.*, (5):2353-65. Epub 2003 Dec 24.
- Choong CS**, Kempainen JA, Zhou ZX, Wilson EM (1996). Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol. Endocrinol.* 10:1527-1535.
- Cleary JD**, Pearson CE (2005). Replication fork dynamics and dynamic mutations: the fork-shift model of repeat instability. *Trends Genet.*, 21:272–280.

- Colussi C**, Illi B, Rosati J, Spallotta F, Farsetti A, Grasselli A, Antonello Maie, Capogrossi MC, Gaetano C (2010). Histone deacetylase inhibitors: Keeping momentum for neuromuscular and cardiovascular diseases treatment. *Pharmacol Res.*, 62(1):3-10.
- Danek A**, Witt TN, Mann K, Schweikert HU, Romalo G, La Spada AR, Fischbeck KH (1994). Decrease in androgen binding and effect of androgen treatment in a case of X-linked bulbospinal neuronopathy. *Clin Invest* 72:892-897.
- Darrington RS**, Butler R, Leigh PN, McPhaul MJ, Gallo JM (2002). Ligand-dependent aggregation of polyglutamine-expanded androgen receptor in neuronal cells. *Neuroreport* 13:2117-2120.
- David G**, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, Benomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel JL, Brice A (1997). Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet.*, (1):65-70.
- Davies SW**, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Roos CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90:537-548.
- Davies SW**, Turmaine M, Cozens BA, Raza AS, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP (1999). From neuronal inclusions to neurodegeneration: neuropathological investigation of a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:981-989.
- Dawson-Scully K**, Lin Y, Imad M, Zhang J, Marin L, Horne JA, Meinertzhagen IA, Karunanithi S, Zinsmaier KE, Atwood HL (2007). Morphological and functional effects of altered cysteine string protein at the Drosophila larval neuromuscular junction. *Synapse*, 61(1):1-16.
- De Luchi D**, Gouyette C, Subirana JA (2003). The influence of size on the thermal stability of oligonucleotides: the case of AT sequences. *Analytical Biochemistry* 322:279-282.
- Dejager S**, Bry-Gaillard H, Bruckert E, Eymard B, Salachas F, LeGuern E, Tardieu S, Chadarevian R, Giral P, Turpin G (2002). A comprehensive endocrine description of Kennedy's disease revealing androgen insensitivity linked to CAG repeat length. *Clin Endocrinol Metab* 87:3893-3901.
- del Río B**, García Pedrero JM, Martínez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS, Ramos S (2004). Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J Biol Chem.*, ;279(37):38294-302.
- Delagoutte E**, Goellner GM, Guo J, Baldacci G, McMurray CT (2008). Single-stranded DNA-binding protein in vitro eliminates the orientation-dependent impediment to polymerase passage on CAG/CTG repeats. *J Biol Chem.*, 283(19):13341-56.

- Dietz** KC, Casaccia P (2010). HDAC inhibitors and neurodegeneration: at the edge between protection and damage. *Pharmacol Res.*, 62(1):11-7.
- DiFiglia** M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277:1990-1993.
- Dotzlaw** H, Moehren U, Mink S, Cato AC, Iniguez Lluhi JA, Baniahmad A (2002). The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Mol Endocrinol* 16:661-673.
- Dubocovich** ML (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci.*, 16(2):50-6.
- Dubocovich** ML, Masana MI, Iacob S, Sauri DM (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 355(3):365-75.
- Duffy** JB (2002). GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34:1-15.
- Ellerby** LM, Hackam AS, Propp SS, Ellerby HM, Rabizadeh S, Cashman NR, Trifiro MA, Pinsky L, Wellington CL, Salvesen GS, Hayden MR, Bredesen DE (1999). Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. *J Neurochem.*, 72(1):185-95.
- Evans** RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240(4854):889-95.
- Fischbeck** KH (1997). Kennedy disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20:152-158.
- Fischbeck** KH (2001). Polyglutamine expansion neurodegenerative disease. *Brain Res Bull*, 56(3-4):161-3.
- Freeman** A, Franciscovich A, Bowers M, Sandstrom DJ, Sanyal S (2011). NFAT regulates pre-synaptic development and activity-dependent plasticity in Drosophila. *Mol Cell Neurosci.*, 46(2):535-47. Epub 2010 Dec 24.
- Fu** YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67:1047-1058.
- Fu** YH, Pizzuti A, Fenwick RG Jr, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, de Jong P et al. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, 255(5049):1256-8.
- Funderburk** SF, Shatkina L, Mink S, Weis Q, Weg-Remers S, Cato AC (2008). Specific N-terminal mutations in the human androgen receptor induce cytotoxicity. *Neurobiol Aging.* 30(11):1851-64.

- Furutani T**, Takeyama K, Tanabe M, Koutoku H, Ito S, Taniguchi N, Suzuki E, Kudoh M, Shibasaki M, Shikama H, Kato S (2005). Human expanded polyglutamine androgen receptor mutants in neurodegeneration as a novel ligand target. *J Pharmacol Exp Ther.*, 315(2):545-52.
- Gatto CL**, Broadie K (2008). Temporal requirements of the fragile X mental retardation protein in the regulation of synaptic structure. *Development* 135:2637-2648
- Gelmann EP** (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology* 20 3001–3015.
- Ghadessy FJ**, Lim J, Abdullah AA, Panet-Raymond V, Choo CK, Lumbroso R, Tut TG, Gottlieb B, Pinsky L, Trifiro MA, Yong EL (1999). Oligospermic infertility associated with an androgen receptor mutation that disrupts interdomain and coactivator (TIF2) interactions. *J Clin Invest.*, 103(11):1517-25.
- Gioeli D**, Black BE, Gordon V, Spencer A, Kesler CT, Eblen ST, Paschal BM, Weber MJ (2006). Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Mol Endocrinol.*, 20(3):503-15. Epub 2005 Nov 10.
- Gioeli D**, Ficarro SB, Kwiek JJ, Aaronson D, Hancock M, Catling AD, White FM, Christian RE, Settlage RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ (2002). Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem.*, 277(32):29304-14.
- Gioeli D**, Paschal BM (2011). Post-translational modification of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol.*, [Epub ahead of print] Review.
- Gomes-Pereira M**, Fortune MT, Ingram L, McAbney JP, Monckton DG (2004). Pms2 is a genetic enhancer of trinucleotide CAG/CTG repeat somatic mosaicism: implications for the mechanism of triplet repeat expansion. *Hum Mol Genet.*, 13(16):1815-25.
- Grierson AJ**, Shaw CE, Miller CC (2001). Androgen induced cell death in SHSY5Y neuroblastoma cells expressing wild-type and spinal bulbar muscular atrophy mutant androgen receptors. *Biochim Biophys Acta.*, 1536(1):13-20.
- Guidetti D**, Vescovini E, Motti L, Ghidoni E, Gemignani F, Marbini A, Patrosso MC, Ferlini A, Solime F (1996). X-linked bulbar and spinal muscular atrophy, or Kennedy disease: clinical, neurophysiological, neuropathological, neuropsychological and molecular study of a large family. *J Neurol Sci* 135:140-148.
- Gurevich I**, Flores AM, Aneskievich BJ (2007). Corepressors of agonist-bound nuclear receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology* 223:288-298.
- Gusella JF**, MacDonald ME (2000). Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 1:109–15.

- Haass C, Selkoe DJ (2007).** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(2):101-12.
- Hahnen E, Hauke J, Tränkle C, Eyüpoglu IY, Wirth B, Blümcke I (2008).** Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, 17(2):169-84.
- Hart RP, Henry GK, Kwentus JA, Leshner RT (1986).** Information processing speed of children with Friedreich's ataxia. *Dev Med Child Neurol* 28:310-378.
- He B, Kempainen JA, Voegel JJ, Gronemeyer H, Wilson EM (1999).** Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH₂-terminal domain. *J Biol Chem.*, 274(52):37219-25.
- He B, Kempainen JA, Wilson EM (2000).** FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH₂-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J Biol Chem.*, 275(30):22986-94.
- Heinlein CA, Chang C (2002).** Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine Reviews* 23:175–200.
- Hirth F (2010).** Drosophila melanogaster in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9(4):504-23. Review.
- Ho LW, Brown R, Maxwell M, Wyttenbach A, Rubinsztein DC (2001).** Wild type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease. *J Med Genet.*, 38(7):450-2.
- Hoang B, Chiba A (2001).** Single-cell analysis of Drosophila larval neuromuscular synapses. *Dev Biol* 229:55-70.
- Holmberg CI, Staniszewski KE, Mensah KN, Matouschek A, Morimoto RI (2004).** Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *EMBO J*, 23(21):4307-18.
- Igarashi S, Koide R, Shimohata T, Yamada M, Hayashi Y, Takano H, Date H, Oyake M, Sato T, Sato A, Egawa S, Ikeuchi T, Tanaka H, Nakano R, Tanaka K, Hozumi I, Inuzuka T, Takahashi H, Tsuji S (1998).** Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nat Genet.*, 18(2):111-7.
- Igarashi S, Tanno Y, Onodera O, Yamazaki M, Sato S, Ishikawa A, Miyatani N, Nagashima M, Ishikawa Y, Sahashi K et al. (1992).** Strong correlation between the number of CAG repeats in androgen receptor genes and the clinical onset of features of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology*, 42:2300–2302.

- Ikeda** H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A (1996). Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet.*, 13(2):196-202.
- Ikonen** T, Palvimo JJ, Janne OA (1997). Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem*, 272(47):29821-8.
- Ishihara** K, Yamagishi N, Saito Y, Adachi H, Kobayashi Y, Sobue G, Ohtsuka K, Hatayama T (2003). Hsp105alpha suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity. *J Biol Chem.*, 278(27):25143-50.
- Jackson** GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME, Zipursky SL (1998). Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron*, 21(3):633-42.
- Jan** LY, Jan YN (1976). Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol* 262:189-214.
- Jan** LY, Jan YN (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79:2700-4.
- Janne** OA, Shan LX (1991). Structure and function of the androgen receptor. *Ann NY Acad Sci*, 62681-91.
- Jenster** G (1998). Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. *Mol Cell Endocrinol* 143:1-7.
- Jenster** G, Trapman J, Brinkmann AO (1993). Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochemical Journal* 293:761-768.
- Jenster** G, van der Korput HAGM, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J, Brinkman AO (1991). Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 5:1396-1404.
- Juzumiene** D, Chang CY, Fan D, Hartney T, Norris JD, McDonnell DP (2005). Single-step purification of full-length human androgen receptor. *Nucl Recept Signal*, 3:e001.
- Katsuno** M, Adachi H, Doyu M, Minamiyama M, Sang C, Kobayashi Y, Inukai A, Sobue G (2003). Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Med.*, 9(6):768-773.
- Katsuno** M, Adachi H, Inukai A, Sobue G (2003). Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Cytogenet Genome Res.*, (1-4):243-51. Review.
- Katsuno** M, Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G (2002). Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35:843-854.

- Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G (2004).** Spinal and bulbar muscular atrophy: ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives. *J Mol Med* 82:298–307.
- Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Morita M, Nakano I, Kanai K, Ito S, Ishikawa K, Mizusawa H, Yamamoto T, Tsuji S, Hasegawa K, Shimohata T, Nishizawa M, Miyajima H, Kanda F, Watanabe Y, Nakashima K, Tsujino A, Yamashita T, Uchino M, Fujimoto Y, Tanaka F, Sobue G; Japan SBMA Interventional Trial for TAP-144-SR (JASMITT) study group (2010).** Efficacy and safety of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (JASMITT study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.*, 9(9):875-84.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I et al. (1994).** CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet.*, 8(3):221-8.
- Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA, Pinsky L (1995).** Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)*n*-expanded neuronopathies. *Hum Mol Genet* 4:523–527.
- Kennedy WR, Alter M, Sung JH (1968).** Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology* 18:671-680.
- Kerkhofs S, Denayer S, Haelens A, Claessens F (2009).** Androgen receptor knockout and knockin mouse models. *J Mol Endocrinol*, 42(1):11–7.
- King LA and Possee RD (1992).** The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman & Hall, London.
- Klockgether T, Evert B (1998).** Genes involved in hereditary ataxies. *Trends Neurosci* 21:413-418.
- Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, Ohtsuka K, Sobue G (2000).** Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem.*, 275(12):8772-8.
- Kobayashi Y, Miwa S, Merry DE, Kume A, Mei L, Doyu M, Sobue G (1998).** Caspase-3 cleaves the expanded androgen receptor protein of spinal and bulbar muscular atrophy in a polyglutamine repeat length-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 252:145-150.
- Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S (1999).** A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum Mol Genet.*, 8(11):2047-5.

- Komure O**, Sano A, Nishino N, Yamauchi N, Ueno S, Kondoh K, Sano N, Takahashi M, Murayama N, Kondo I et al (1995). DNA analysis in hereditary dentatorubral-pallidoluyasian atrophy: correlation between CAG repeat length and phenotypic variation and the molecular basis of anticipation. *Neurology*, 45(1):143-9.
- Kong PJ**, Byun JS, Lim SY, Lee JJ, Hong SJ, Kwon KJ, Kim SS (2008). Melatonin Induces Akt Phosphorylation through Melatonin Receptor- and PI3K-Dependent Pathways in Primary Astrocytes. *Korean J Physiol Pharmacol.*, 12(2):37-41.
- Kuhlenbäumer G**, Kress W, Ringelstein EB, Stögbauer F (2001). Thirty-seven CAG repeats in the androgen receptor gene in two healthy individuals. *J Neurol.*, 248(1):23-6.
- Kumar R**, Atamna H, Zakharov MN, Bhasin S, Khan SH, Jasuja R (2011). Role of the androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer, and spinal and bulbar muscular atrophy. *Life Sci.*, 88(13-14):565-71. Review.
- La Spada AR**, Peterson KR, Meadows SA, McClain ME, Jeng G, Chmelar RS, Haugen HA, Chen K, Singer MJ, Moore D, Trask BJ, Fischbeck KH, Clegg CH, McKnight GS (1998). Androgen receptor YAC transgenic mice carrying CAG 45 alleles show trinucleotide repeat instability. *Hum Mol Genet* 7:959-967.
- La Spada AR**, Taylor JP (2003). Polyglutamines placed into context. *Neuron*, 38(5):681-4.
- La Spada AR**, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck H (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352:77-79.
- LaFevre-Bernt MA**, Ellerby LM (2003). Kennedy's disease. Phosphorylation of the polyglutamine-expanded form of androgen receptor regulates its cleavage by caspase-3 and enhances cell death. *J Biol Chem* 278:34918-34924.
- Lansbury PT**, Lashuel HA (2006). A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*, 443(7113):774-9.
- Lee JW**, Lee SK (2004). Mammalian two-hybrid assay for detecting protein-protein interactions in vivo. *Methods Mol Biol.*, 261:327-36.
- Lee SH**, Chun W, Kong PJ, Han JA, Cho BP, Kwon OY, Lee HJ, Kim SS (2006). Sustained activation of Akt by melatonin contributes to the protection against kainic acid-induced neuronal death in hippocampus. *J Pineal Res.*, 40(1):79-85.
- Li M**, Chevalier-Larsen ES, Merry DE, Diamond MI (2007). Soluble androgen receptor oligomers underlie pathology in a mouse model of spinobulbar muscular atrophy. *J Biol Chem.*, 282(5):3157-64. Epub 2006 Nov 22.
- Li M**, Miwa S, Kobayashi Y, Merry DE, Yamamoto M, Tanaka F, Doyu M, Hashizume Y, Fischbeck KH, Sobue G (1998). Nuclear inclusions of the androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol.*, 44(2):249-54.

- Liao G**, Chen LY, Zhang A, Godavarthy A, Xia F, Ghosh JC, Li H, Chen JD (2003). Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *J Biol Chem* 278:5052–5061.
- Liao M**, Zhou Z, Wilson EM (1999). Redox-dependent DNA binding of the purified androgen receptor: evidence for disulfide-linked androgen receptor dimers. *Biochemistry.*, 38(30):9718-27.
- Lin HK**, Yeh S, Kang HY, Chang C (2001). Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(13):7200-7205.
- Ling D**, Song HJ, Garza D, Neufeld TP, Salvaterra PM (2009). Abeta42-induced neurodegeneration via an age-dependent autophagic-lysosomal injury in *Drosophila*. *PLoS One*, ;4(1):e4201.
- Liu G**, Chen X, Bissler JJ, Sinden RR, Leffak M (2010). Replication-dependent instability at (CTG) x (CAG) repeat hairpins in human cells. *Nat Chem Biol.*, 6(9):652-9. 1.
- Lnenicka GA**, Theriault K, Monroe R (2006). Sexual differentiation of identified motor terminals in *Drosophila* larvae. *J Neurobiol.*, (5):488-98.
- Lubs HA** (1969). A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 21:231-244.
- Luckow VA**, Lee SC, Barry GF, Olins PO (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol.*, 67(8):4566-79.
- Lyon MF**, Hawkes SG (1970). X-linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature* 227:1217-1219.
- Mahadevan M**, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barceló J, O'Hoy K et al. (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science*, ;255(5049):1253-5.
- Mahr A**, Aberle H (2005). The expression pattern of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. *Gene Expr Patterns.*, (3):299-309.
- Marivoet S**, Van Dijck P, Verhoeven G, Heyns W (1992). Interaction of the 90-kDa heat shock protein with native and *in vitro* translated androgen receptor and receptor fragments. *Molecular and Cellular Endocrinology* 88:165–174.
- Marsh JL**, Thompson LM (2006). *Drosophila* in the study of neurodegenerative disease. *Neuron*, (1):169-78. Review.
- Martin JP**, Bell J (1943). A pedigree of mental defect showing sex linkage. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, London.* 6:154-156.

- Martindale** D, Hackam A, Wieczorek A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, Singaraja R, Kazemi-Esfarjani P, Devon R, Kim SU, Bredesen DE, Tufaro F, Hayden MR (1998). Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet.*, 18(2):150-4.
- Matilla** T, Volpini V, Genís D, Rosell J, Corral J, Dávalos A, Molins A, Estivill X (1993). Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) via the expansion of the SCA1 CAG-repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias. *Hum Mol Genet.*, 2(12):2123-8.
- Mazzucchelli** S, De Palma A, Riva M, D'Urzo A, Pozzi C, Pastori V, Comelli F, Fusi P, Vanoni M, Tortora P, Mauri P, Regonesi ME (2009). Proteomic and biochemical analyses unveil tight interaction of ataxin-3 with tubulin. *Int J Biochem Cell Biol.*, 41(12):2485-92.
- McCabe** BD, Hom S, Aberle H, Fetter RD, Marques G, Haerry TE, Wan H, O'Connor MB, Goodman CS, Haghghi AP (2004). Highwire regulates presynaptic BMP signaling essential for synaptic growth. *Neuron*, 41(6):891-905.
- McCampbell** A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet.*, 9(14):2197-202.
- McLean** HE, Warne GL, Zajac JD (1996). Spinal and bulbar muscular atrophy: androgen receptor dysfunction caused by a trinucleotide repeat expansion. *J Neurol Sci* 135:149-157.
- McManamny** P, Chy HS, Finkelstein DI, Craythorn RG, Crack PJ, Kola I, Cheema SS, Horne MK, Wreford NG, O'Bryan MK, De Kretser DM, Morrison JR (2002). A mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 11:2103-2111.
- Menon** RP, Pastore A (2006). Expansion of amino acid homo-sequences in proteins: insights into the role of amino acid homo-polymers and of the protein context in aggregation. *Cell Mol Life Sci.*, 63(14):1677-85.
- Merry** DE, Kobayasi Y, Bailey CK, Taye AA, Fischbeck KH (1998). Cleavage, aggregation and toxicity of the expanded androgen receptor in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 7:693-701.
- Merry** DE, McCampbell A, Taye AA, Winston RL, Fischbeck KH (1996). Toward a mouse model for spinal and bulbar muscular atrophy: effect of neuronal expression of androgen receptor in transgenic mice. *Am J Hum Genet* 59 (Suppl.) A271.
- Messaed** C, Rouleau GA (2009). Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases. *Neurobiol Dis.*, 34(3):397-405. Review.
- Mhatre** AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, Pinsky L (1993). Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet.*, 5(2):184-8.

- Migeon** BR, Brown TR, Axelman J, Migeon CJ (1981). Studies of the locus for androgen receptor: localization on the human X chromosome and evidence for homology with the Tfm locus in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6339-6343.
- Miller** JW, Selhub J, Joseph JA (1996). Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Rad Biol Med*, 21(2):241-249.
- Minamiyama** M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Sobue G (2004). Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet.*, 13(11):1183-92.
- Miner** JN, Chang W, Chapman MS, Finn PD, Hong MH, López FJ, Marschke KB, Rosen J, Schrader W, Turner R, van Oeveren A, Viveros H, Zhi L, Negro-Vilar A (2007). An orally active selective androgen receptor modulator is efficacious on bone, muscle, and sex function with reduced impact on prostate. *Endocrinology.*, 148(1):363-73. Epub 2006 Oct 5.
- Mirkin** SM (2007). Expandable DNA repeats and human disease. *Nature*, 447(7147):932-40.
- Monks** DA, Rao P, Mo K, Johansen JA, Lewis G, Kemp MQ (2008). Androgen receptor and Kennedy disease/spinal bulbar muscular atrophy. *Horm Behav.*, 53(5):729-40. Review.
- Montie** HL, Cho MS, Holder L, Liu Y, Tsvetkov AS, Finkbeiner S, Merry DE (2009a). Cytoplasmic retention of polyglutamine-expanded androgen receptor ameliorates disease via autophagy in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet.*, 18(11):1937-50.
- Montie** HL, Merry DE (2009b). Autophagy and access: understanding the role of androgen receptor subcellular localization in SBMA. *Autophagy*, 5(8):1194-7.
- Montie** HL, Pestell HG, Merry DE (2011). SIRT1 Modulates Aggregation and Toxicity through Deacetylation of the Androgen Receptor in Cell Models of SBMA. *J Neurosci.*, 31(48):17425-36.
- Moulder** KL, Onodera O, Burke JR, Strittmatter WJ, Johnson EM Jr (1999). Generation of neuronal intranuclear inclusions by polyglutamine-GFP: analysis of inclusion clearance and toxicity as a function of polyglutamine length. *J Neurosci.*, 19(2):705-15.
- Muchowski** PJ, Ning K, D'Souza-Schorey C, Fields S (2002). Requirement of an intact microtubule cytoskeleton for aggregation and inclusion body formation by a mutant huntingtin fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(2):727-32.
- Muchowski** PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, Hartl FU (2000). Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(14):7841-6.

- Muqit** MM, Feany MB (2002). Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach? *Nat Rev Neurosci.*, 3(3):237-43.
- Murata** T, Suzuki E, Ito S, Sawatsubashi S, Zhao Y, Yamagata K, Tanabe M, Fujiyama S, Kimura S, Ueda T, Matsukawa H, Kouzmenko A, Furutani T, Kuranaga E, Miura M, Takeyama K, Kato S (2008). RNA-binding protein hoip accelerates polyQ-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 72(9):2255-61
- Nagai** Y, Onodera O, Chun J, Strittmatter WJ, Burke JR (1999). Expanded polyglutamine domain proteins bind neurofilament and alter the neurofilament network. *Exp Neurol.*, 155(2):195-203.
- Nahhas** FA, Garbern J, Krajewski KM, Roa BB, Feldman GL (2005). Juvenile onset Huntington disease resulting from a very large maternal expansion. *Am J Med Genet A.*, 137A(3):328-31.
- Nakajima** H, Kimura F, Nakagawa T, Ikemoto T, Furutama D, Shinoda K, Kato S, Shimizu A, Ohsawa N (1997). Effects of androgen receptor polyglutamine tract expansion on proliferation of NG108-15 cells. *Neurosci Lett* 222:83-86.
- Nakamura** K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I (2001). SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet.*, 10(14):1441-8.
- Narlikar** GJ, Fan HY, Kingston RE (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108:475-487.
- Nedelsky** NB, Pennuto M, Smith RB, Palazzolo I, Moore J, Nie Z, Neale G, Taylor JP (2010). Native functions of the androgen receptor are essential to pathogenesis in a *Drosophila* model of spinobulbar muscular atrophy. *Neuron*, 67(6):936-52.
- Nedelsky** NB, Todd PK, Taylor JP (2008). Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. *Biochim Biophys Acta.*, 1782(12):691-9.
- Nestor** CE, Monckton DG (2011). Correlation of Inter-Locus Polyglutamine Toxicity with CAG•CTG Triplet Repeat Expandability and Flanking Genomic DNA GC Content. *PLoS One.*, 6(12):e28260.
- Neuschmidt-Kaspar** F, Gast A, Peterziel H, Schneikert J, Muigg A, Ransmayr G, Klocker H, Bartsch G, Cato AC (1996). CAG-repeat expansion in androgen receptor in Kennedy's disease is not a loss of function mutation. *Mol Cell Endocrinol* 117:149-156.
- Nonno** R, Lucini V, Pannacci M, Mazzucchelli C, Angeloni D, Fraschini F, Stankov BM (1998). Pharmacological characterization of the human melatonin Mel1a receptor following stable transfection into NIH3T3 cells. *Br J Pharmacol.*, 124(3):485-92.

- Nonno** R, Pannacci M, Lucini V, Angeloni D, Fraschini F, Stankov BM (1999). Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. *Br J Pharmacol.*, 127(5):1288-94.
- Nozaki** K, Onodera O, Takano H, Tsuji S (2001). Amino acid sequences flanking polyglutamine stretches influence their potential for aggregate formation. *Neuroreport.*, 12(15):3357-64.
- O'Reilly** DR, Miller LK und Luckow VA (1992). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, W.H. Freeman and Company, New York.
- Orr** CR, Montie HL, Liu Y, Bolzoni E, Jenkins SC, Wilson EM, Joseph JD, McDonnell DP, Merry DE (2010). An interdomain interaction of the androgen receptor is required for its aggregation and toxicity in spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurosci Biol Chem.*, 285(46):35567-77.
- Orr** HT, Zoghbi HY (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 30:575-621. Review.
- Otto** CJ, Almqvist E, Hayden MR, Andrew SE (2001). The "flap" endonuclease gene FEN1 is excluded as a candidate gene implicated in the CAG repeat expansion underlying Huntington disease. *Clin Genet.*, 59(2):122-7.
- Palazzolo** I, Burnett BG, Young JE, Brenne PL, La Spada AR, Fischbeck KH, Howell BW, Pennuto M (2007). Akt blocks ligand binding and protects against expanded polyglutamine androgen receptor toxicity. *Hum Mol Genet.*, 16(13):1593-603.
- Palazzolo** I, Gliozzi A, Rusmini P, Sau D, Crippa V, Simonini F, Onesto E, Bolzoni E, Poletti A (2008). The role of the polyglutamine tract in androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 108(3-5):245-53. Epub 2007 Sep 11.
- Palazzolo** I, Nedelsky NB, Askew CE, Harmison GG, Kasantsev AG, Taylor JP, Fischbeck KH, Pennuto M (2010). B2 attenuates polyglutamine-expanded androgen receptor toxicity in cell and fly models of spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurosci Res.*, 88(10):2207-16.
- Palazzolo** I, Stack C, Kong L, Musaro A, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Taylor JP, Sumner CJ, Fischbeck KH, Pennuto M (2009). Overexpression of IGF-1 in muscle attenuates disease in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron*, 63(3):316-28.
- Palombo** F, Iaccarino I, Nakajima E, Ikejima M, Shimada T, Jiricny J (1996). hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol.*, 6(9):1181-4.
- Pan** L, Zhang YQ, Woodruff E, Broadie K (2004). The *Drosophila* fragile X gene negatively regulates neuronal elaboration and synaptic differentiation. *Curr Biol.*, 14(20):1863-70.

- Pandey UB**, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, Schwartz SL, DiProspero NA, Knight MA, Schuldiner O, Padmanabhan R, Hild M, Berry DL, Garza D, Hubbert CC, Yao TP, Baehrecke EH, Taylor JP (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, 447(7146):859-63.
- Pandi-Perumal SR**, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R (2006). Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBSJ.*, 273, 2813–2838.
- Pandi-Perumal SR**, Srinivasan V, Spence DW, Moscovitch A, Hardeland R, Brown GM, Cardinali DP (2009). Ramelteon: a review of its therapeutic potential in sleep disorders. *Adv Ther.*, 26(6):613-26.
- Pappolla M**, Bozner P, Soto C, Shao H, Robakis NK, Zagorski M, Frangione B, Ghiso J (1998). Inhibition of Alzheimer beta-fibrillogenesis by melatonin. *J Biol Chem* 273:7185-7188.
- Parodi S**, Pennuto M (2011). Neurotoxic effects of androgens in spinal and bulbar muscular atrophy. *Front Neuroendocrinol.*, 32(4):416-25.
- Paulson HL**, Bonini NM, Roth KA (2000). Polyglutamine disease and neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12957-12958.
- Pearson CE**, Nichol Edamura K, Cleary JD (2005). Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet.*, 6(10):729-42.
- Perutz MF** (1999). Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Trends Biochem Sci* 24:58-63.
- Perutz MF**, Johnson T, Suzuki M, Finch JT (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(12):5355–8.
- Petruska J**, Hartenstine MJ, Goodman MF (1998). Analysis of strand slippage in DNA polymerase expansions of CAG/CTG triplet repeats associated with neurodegenerative disease. *J Biol Chem.*, 273(9):5204-10.
- Pratt WB**, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ (2004). Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 40:41–58.
- Pratt WB**, Toft DO (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306-360.
- Pulst SM**, Santos N, Wang D, Yang H, Huynh D, Velazquez L, Figueroa KP (2005). Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain*, 128(Pt 10):2297-303.
- Ranganathan S**, Fischbeck KH (2010). Therapeutic approaches to spinal and bulbar muscular atrophy. *Trends Pharmacol Sci.*, 31(11):523-7.

- Ranganathan S**, Harmison GG, Meyertholen K, Pennuto M, Burnett BG, Fischbeck KH (2009). Mitochondrial abnormalities in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet.*, (1):27-42. Epub 2008 Sep 29.
- Ranum LP**, Chung MY, Banfi S, Bryer A, Schut LJ, Ramesar R, Duvick LA, McCall A, Subramony SH, Goldfarb L et al (1994). Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type I: evidence for familial effects on the age at onset. *Am J Hum Genet.*, 55(2):244-52.
- Raske C**, Hagerman PJ (2009). Molecular pathogenesis of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *J Investig Med.*, 57(8):825-9. Review.
- Raymond S**, Weintraub L (1959). Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* 130:711.
- Reddy PS**, Housman DE (1997). The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr Opin Cell Biol* 9:364-372.
- Redman J**, Armstrong S, Ng KT, (1983). Free-running activity rhythms in the rat: Entrainment by melatonin. *Science*, 219, 1089–1090.
- Reiter RJ** (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol*, 56(3):359–384.
- Reiter RJ**, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GC, Acuna-Castroviejo D (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 18:1–11.
- Richards RI** (2001). Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Hum Mol Genet.*, 10(20):2187-94.
- Rimler A**, Culig Z, Levy-Rimler G, Lupowitz Z, Klocker H, Matzkin H, Bartsch G, Zisapel N (2001). Melatonin elicits nuclear exclusion of the human androgen receptor and attenuates its activity. *Prostate*, 49(2):145-54.
- Rimler A**, Culig Z, Lupowitz Z, Zisapel N (2002). Nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 81(1):77-84.
- Roos J**, Hummel T, Ng N, Klämbt C, Davis GW (2000). Drosophila Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron* 26:371-382.
- Ross CA** (1997). Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron*, 19:1147-1150.
- Ross CA** (2002). Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron*, 35(5):819-22.
- Ross CA**, Poirier MA (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Natl Med* 10 (Suppl.) 10-17.

- Rossetto** MG, Zanarella E, Orso G, Scorzeto M, Megighian A, Kumar V, Delgado-Escueta AV, Daga A (2011). Defhc1.1, a homologue of the juvenile myoclonic gene EFHC1, modulates architecture and basal activity of the neuromuscular junction in *Drosophila*. *Hum Mol Genet.*, 20(21):4248-57.
- Rusmini** P, Bolzoni E, Crippa V, Onesto E, Sau D, Galbiati M, Piccolella M, Poletti A (2010). Proteasomal and autophagic degradative activities in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurobiol Dis.*, 40(2):361-9.
- Rusmini** P, Simonini F, Crippa V, Bolzoni E, Onesto E, Cagnin M, Sau D, Ferri N, Poletti A (2011). 17-AAG increases autophagic removal of mutant androgen receptor in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurobiol Dis.*, 41(1):83-95. Epub 2010 Sep 9.
- Sainz** RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan D-X, Lopez-Burillo S, Reiter RJ (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 1407–1426.
- Santagostino-Barbone** MG, Masoero E, Spelta V, Lucchelli A (2000). 2-Phenylmelatonin: a partial agonist at enteric melatonin receptors. *Pharmacol Toxicol.*, 87(4):156-60.
- Sarathi** J, Elefant F (2011). dTip60 HAT Activity Controls Synaptic Bouton Expansion at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *PLoS One*, 6(10):e26202.
- Saudou** F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, 95(1):55-66.
- Saunders** HM, Bottomley SP (2009). Multi-domain misfolding: understanding the aggregation pathway of polyglutamine proteins. *Protein Eng Des Sel.*, 22(8):447-51.
- Schmidt** BJ, Greenberg CR, Allingham-Hawkins DJ, Spriggs EL (2002). Expression of X-linked bulbospinal muscular atrophy (Kennedy disease) in two homozygous women, *Neurology* 59:770–772.
- Schwenkert** I, Eltrop R, Funk N, Steinert JR, Schuster CM, Scholz H (2008). The hangover gene negatively regulates bouton addition at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Mech Dev* 700-711.
- Service** PM, Hutchinson EW, MacKinley MD, Rose MR (1985). Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Physiol. Zool.*, 58: 380–389.
- Sinadinos** C, Burbidge-King T, Soh D, Thompson LM, Marsh JL, Wyttenbach A, Mudher AK (2009). Live axonal transport disruption by mutant huntingtin fragments in *Drosophila* motor neuron axons. *Neurobiol Dis.*, 34(2):389-95.

- Sivanandam** A, Murthy S, Chinnakannu K, Bai VU, Kim SH, Barrack ER, Menon M, Reddy GP (2011). Calmodulin protects androgen receptor from calpain-mediated breakdown in prostate cancer cells. *J Cell Physiol.*, 226(7):1889-96.
- Sobue** G, Doyu M, Kachi T, Yasuda T, Mukai E, Kumagai T, Mitsuma T (1993). Subclinical phenotypic expressions in heterozygous females of X-linked recessive bulbospinal neuronopathy. *J Neurol Sci.*, 117(1-2):74-8.
- Sobue** G, Hashizume Y, Mukai E, Hirayama M, Mitsuma T, Takahashi A (1989). X-linked recessive bulbospinal neuronopathy. A clinicopathological study. *Brain* 112:209-232.
- Sopher** BL, Thomas PS Jr, LaFevre-Bernt MA, Holm IE, Wilke SA, Ware CB, Jin LW, Libby RT, Ellerby LM, La Spada AR (2004). Androgen receptor YAC transgenic mice recapitulate SBMA motor neuronopathy and implicate VEGF164 in the motor neuron degeneration. *Neuron*, 41(5):687-99.
- Spadoni** G, Stankov B, Duranti A, Biella G, Lucini V, Salvatori A, Fraschini F (1993). 2-Substituted 5-methoxy-N-acyltryptamines: synthesis, binding affinity for the melatonin receptor, and evaluation of the biological activity. *J Med Chem.*, 36(25):4069-74.
- Srinivasan** V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJ, Esquifino AI, Hardeland R, Cardinali DP (2005). Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res* 7:293-318
- Steinberg** H, Wagner A (2008). [Hans Steinert: 100 years of myotonic dystrophy].[Article in German] *Nervenarzt*, 79(8):961-2, 965-70.
- Stenoien** DL, Cummings CJ, Adams HP, Mancini MG, Patel K, DeMartino GN, Marcelli M, Weigel NL, Mancini MA (1999). Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum Mol Genet.*, 8(5):731-41.
- Stewart** BA, Atwood HL, Renger JJ, Wang J, Wu C-F (1994). Improved stability of Drosophila larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J Comp Physiol A.*, 175:179 -191.
- Suster** ML, Bate M (2002). Embryonic assembly of a central pattern generator without sensory input. *Nature*, 416(6877):174-8.
- Suzuki** E, Zhao Y, Ito S, Sawatsubashi S, Murata T, Furutani T, Shirode Y, Yamagata K, Tanabe M, Kimura S, Ueda T, Fujiyama S, Lim J, Matsukawa H, Kouzmenko AP, Aigaki T, Tabata T, Takeyama K, Kato S (2009). Aberrant E2F activation by polyglutamine expansion of androgen receptor in SBMA neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(10):3818-22.
- Takahashi** T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M, Onodera O (2008). Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet.*, 17(3):345-56. Epub 2007 Oct 18.

- Takeyama K**, Ito S, Yamamoto A, Tanimoto H, Furutani T, Muira M, Tabata T, Kato S (2002). Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in *Drosophila*. *Neuron* 35:855-864.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group**. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6):971-83.
- Thomas M**, Dadgar N, Aphale A, Harrell JM, Kunkel R, Pratt WB, Lieberman AP (2004). Androgen receptor acetylation site mutations cause trafficking defects, misfolding, and aggregation similar to expanded glutamine tracts. *J Biol Chem* 279:8389-8395.
- Thomas M**, Yu Z, Dadgar N, Varambally S, Yu J, Chinnaiyan AM, Lieberman AP (2005). The unfolded protein response modulates toxicity of the expanded glutamine androgen receptor. *J Biol Chem.*, 280(22):21264-71.
- Tokui K**, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, Sobue G (2009). 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet.*, 18(5):898-910. Epub 2008 Dec 9.
- Towbin H**, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24:145-149.
- Tut TG**, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL (1997). Long polyglutamine tracts in the androgen are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3777-3782.
- Urnov FD**, Wolffe AP (2001). Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance). *Oncogene* 20:2991-3006.
- Veldscholte J**, Borrevoets CA, Zegers ND, van der Kwast TH, Grootegoed JA, Mulder E (1992). Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. *Biochemistry* 31:7422-7430.
- Verhoef LG**, Lindsten K, Masucci MG, Dantuma NP (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet.*, 11(22):2689-700.
- von Mikecz A** (2009). PolyQ fibrillation in the cell nucleus: who's bad? *Trends Cell Biol.*, 19(12):685-91. Epub 2009 Sep 30.
- Walcott JL**, Merry DE (2002). Ligand promotes intranuclear inclusions in a novel cell model of spinal and bulbar muscular atrophy. *J Biol Chem* 277:50855-50859.

- Wang C**, Young WJ, Chang C (1999). Androgen effects on the solubility and conformational change of the androgen receptor in baculovirus expression system. *Mol Cell Biochem.*, 195(1-2):19-23.
- Wang L**, Hsu CL, Chang C (2005). Androgen receptor corepressors: An overview. *Prostate* 63:117-130.
- Wang X** (2009). The Antiapoptotic Activity of Melatonin in Neurodegenerative Diseases. *CNS Neurosci Ther.*, 15(4):345-57, Review.
- Wang X**, Figueroa BE, Stavrovskaya IG, Zhang Y, Sirianni AC, Zhu S, Day AL, Kristal BS, Friedlander RM (2009). Methazolamide and melatonin inhibit mitochondrial cytochrome C release and are neuroprotective in experimental models of ischemic injury. *Stroke*, 40(5):1877-85.
- Warrick JM**, Paulson HL, Gray-Board GL, Bui QT, Fischbeck KH, Pittman RN, Bonini NM (1998). Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in Drosophila. *Cell*, 93(6):939-49.
- Watson NV**, Freeman LM, Breedlove SM (2001). Neuronal size in the spinal nucleus of the bulbocavernosus: direct modulation by androgen in rats with mosaic androgen insensitivity. *J Neurosci* 21:1062–1066.
- Welch WJ**, Diamond MI (2001). Glucocorticoid modulation of androgen receptor nuclear aggregation and cellular toxicity is associated with distinct forms of soluble expanded polyglutamine protein. *Hum Mol Genet.*, 10(26):3063-74.
- White JH**, Fernandes I, Mader S, Yang XJ (2004). Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam Horm* 68:123–143.
- Wilson JD** (1996). Role of dihydrotestosterone in androgen action. *Prostate Supplement* 6:88–92.
- Wong CI**, Zhou ZX, Sar M, Wilson EM (1993). Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH2-terminal and steroid-binding domains. *J Biol Chem.*, 268(25):19004-12.
- Wu YH**, Swaab DF (2005). The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res.*, 38:145–52.
- Xie YB**, Sui YP, Shan LX, Palvimo JJ, Phillips DM, Jänne OA (1992). Expression of androgen receptor in insect cells. Purification of the receptor and renaturation of its steroid- and DNA-binding functions. *J Biol Chem.*, 267(7):4939-48.
- Yamada M**, Sato T, Tsuji S, Takahashi H (2008). CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.*, 115:71–86.
- Yang W**, Dunlap JR, Andrews RB, Wetzel R (2002). Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum Mol Genet.*, 11(23):2905-17.

- Zhang S**, Feany MB, Saraswati S, Littleton JT, Perrimon N (2009). Inactivation of *Drosophila* Huntingtin affects long-term adult functioning and the pathogenesis of a Huntington's disease model. *Dis Model Mech.*, 2(5-6):247-66.
- Zhou ZX**, Sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM (1994). A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences. *Journal of Biological Chemistry* 269:13115–13123.
- Zhu Z**, Becklin RR, Desiderio DM, Dalton JT (2001). Identification of a novel phosphorylation site in human androgen receptor by mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.*, 284(3):836-44.
- Zhuchenko O**, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxie (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15:62-69.
- Zong H**, Chi Y, Wang Y, Yang Y, Zhang L, Chen H, Jiang J, Li Z, Hong Y, Wang H, Yun X, Gu J (2007). Cyclin D3/CDK11p58 complex is involved in the repression of androgen receptor. *Mol Cell Biol.*, 27(20):7125-42.

Danksagungen

An erster Stelle gilt mein Dank natürlich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Andy Cato, der es mir ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit zu absolvieren. Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Christoph Schuster vom neurobiologischen Institut in Heidelberg, der mir zusammen mit seinen Mitarbeitern half zu lernen, wie *Drosophila* Larven präpariert werden. Zudem möchte ich mich bei Dr. Sarah Funderburk bedanken, die mich während meiner Diplomarbeit in das Projekt einführte.

Weiterer Dank gilt meinen Kollegen. Vor allem Tobi (VADDER!), der mir IMMER fachlich und moralisch zu Seite stand und jederzeit für jeden Spaß zu haben war!! Danke, Jutta!!! Zum einen für die vielen tollen Mittagspausen, die wir zusammen verbracht haben, darüber hinaus dafür, dass ich sie jederzeit um Hilfe bitten konnte, ebenso wie Anne und Rebecca. Anne danke ich dafür, dass sie viel Zeit opferte, um die Fliegen zu versorgen und mir damit den Rücken frei hielt. Katja danke ich für ihre Hilfe mit den Hormon-Bindestudien und Erald für seine Ratschläge bei den Mini-Western Blot-Gelen! Antje danke ich für ihre fachliche Beratung und zu Danilo sind nur zwei Worte zu sagen: *Schmetz* und *42!!!* Ich danke meiner ganzen Arbeitsgruppe für die tolle Zeit und möchte auch David nicht vergessen, der inzwischen wieder in Ghana ist und mir ein Vorbild war, die Dinge etwas lockerer zu sehen. Ebenso Jana, die wirklich immer zu Hilfe eilte, egal, welches Problem es gab! Zudem Emml (*Maachi!*) und Ambili! Ohne euch alle (und die tollen Kuchen-Runden) hätte es keinen Spaß gemacht!!!

Im Doktorandenzimmer habe ich mich immer wohl gefühlt und ich werde mich immer an die lustige Zeit erinnern, die ich mit Dana, Steffi, Katja, Mark (*Hi Mark!*), Sekretöse Oli (*Juhuu!*), Kadda, Isabella, Olga, Judith, Arul und Dieter hatte! Es wurde nie langweilig mit euch!!!

Darüber hinaus habe ich im gesamten Institut viele tolle Leute kennen gelernt, mit denen sich der Labor-Alltag durch ein Schwätzchen verkürzen ließ! Des Weiteren haben mir Maryam und Marga bei technischen Fragen geholfen, danke euch!

Zu guter letzt sind noch meine Freunde und meine Familie zu erwähnen, welche meine Launen ertragen haben, mich bei Laune hielten und immer Verständnis hatten, wenn ich kaum Zeit für sie hatte! ♥ Besonderer Dank gilt auch allen Menschen, die ich jetzt vergessen habe....

Es gibt nur ein einziges Gut für den Menschen: Die Wissenschaft. Und nur ein einziges Übel: Die Unwissenheit.

(Sokrates)

Curriculum Vitae

Name: Manuela Evelin Ritz
Geburtsdatum, -ort: 11. Juli 1981, Stuttgart
Nationalität: deutsch
Anschrift: Rüppurrer Straße 20e
76137 Karlsruhe
Telefon: 0162 - 9 25 73 18
E-Mail: manuelaritz@gmx.de

Universitäre Ausbildung:

01/2009 bis 02/2012: Doktorandin am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Campus Nord (ehemals Forschungszentrum)
10/2003 bis 12/2008: Grund- und Hauptstudium der Biologie mit den
Vertiefungsfächern Entwicklungsbiologie, Zoologie und
Genetik (Abschluss: Diplom-Biologin)
Auslandsaufenthalte: August/September 2007: Mehrwöchiges, eigenständig
organisiertes zoologisches Praktikum an der Nation
Taiwan University (NTU)

Berufliche Ausbildung:

07/2001 bis 07/2003 Berufsausbildung zur pharmazeutisch-kaufmännischen
Angestellten (PKA) (Abschluss: PKA)
Preise und Auszeichnungen: Preis und Auszeichnung der Landsapothekerkammer
Baden-Württemberg als Jahresbeste

Schulische Ausbildung:

09/1992 bis 06/2001 Hartmanni-Gymnasium, Eppingen (Abschluss: Allgemeine
Hochschulreife)
Preise und Auszeichnungen: Preis in Klasse 8 für hervorragende Leistungen und als „in
jeder Hinsicht vorbildliche Schülerin“
Schülersprecherin in Klasse 12

Publikationen

- Publikationen:** Jochum T, Ritz ME, Schuster C, Funderburk SF, Jehle K, Schmitz K, Brinkmann F, Hirtz M, Moss D, Cato ACB (2012). Toxic and non-toxic aggregates from the SBMA and normal forms of androgen receptor have distinct oligomeric structures. *BBA- Molecular Mechanisms of Disease* (in Druck)
- Poster-Präsentationen:** Jochum T, Ritz ME, Moss D, Cato AC (2010). Fibrillar Oligomers are common structures that determine toxicity of misfolded and aggregated androgen receptor. *Nuclear Receptors: Development (X8), Keystone, Colorado, USA*
- Jochum T, Ritz ME, Mos D, Cato AC (2010). Fibrillar oligomers are common structures that determine toxicity of misfolded and aggregated androgen receptor. *Androgens 2010, Leuven, Belgien*
- Vorträge:** Jochum T, Ritz ME, Moss D, Cato AC (2009). Influence of post-translational modifications on the androgen receptor in SBMA. *IV Meeting on the MOLECULAR MECHANISMS OF NEURODEGENERATION, Mailand, Italien*
- Lehre:** Betreuung F2-Praktikum "Signaltransduktion und Genregulation"
Betreuung von Praktikanten und Studenten