Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Zur Funktion der *Corticotropin releasing hormone* Rezeptoren in der Maus: Identifizierung von Rezeptor-abhängigen Signaltransduktionswegen und intrazellulären Interaktionspartnern

Juliane Wunsch

Vollständiger Abdruck von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Wurst

2. Univ.-Prof. Dr. Kay Schneitz

Die Dissertation wurde am 8.12.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.01.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Abkürzungsverzeichnis……..…….....6

Abkürzungsverzeichnis……...8

Zusammenfassung.....11

1 Einleitung..... 13

1.1 Allgemeine Stressdefinition 13

1.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-Achse 13

1.2.1 Die Regulation der HPA-Achse unter physiologischen Bedingungen 13

1.2.2 Die Familie der CRH-verwandten Neuropeptide und ihre Rezeptoren 15

1.2.3 Spezielle Funktionen des CRH-Systems 17

1.2.4 CRH-abhängige Signaltransduktionwege 19

1.2.5 Die Dysregulation der HPA-Achse und affektive Störungen 21

1.3 Genetische Manipulation des CRH-R1 bei Mäusen 24

1.4 Ziel dieser Arbeit 26

2 Materialien..... 29

2.1 Chemikalien und Lösungen 29

2.2 Enzyme 30

2.3 Nukleotide und Nukleinsäuren 31

2.4 Kits und gebrauchsfertige Materialien 31

2.5 Puffer und Medien 32

2.6 Medien für die Kultur von Hefen 34

2.7 Verbrauchsmaterialien 35

2.8 Geräte 35

2.9 Antikörper 36

2.10 Besondere Reagenzien und Materialien für Immundetektion 36

2.11 Bakterien- und Hefestämme 37

2.12 Plasmide 37

2.13 Oligonukleotide 37

2.13.1 Quantitative real-time PCR 37

2.13.2 GST-pull-down 39

2.13.3 Sonstige Primer 39

3 Methoden 40

3.1 Mikrobiologische Methoden 40

3.1.1 Kultivierung von Bakterien 40

3.1.2 Herstellung chemo-kompetenter E .coli Bakterien 40

3.1.3 Herstellung elektro-kompetenter E. coli Bakterien 40

3.1.4 Transformation von Bakterien 41

3.2. Präparation und Analyse von Nukleinsäuren 42

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien 42

3.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" 42

3.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren 42

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese 43

3.2.5 Restriktionsverdau von DNA 43

3.2.6 Ligation von DNA 43

3.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 44

3.2.8 DNA-Sequenzierung und Computer-gestützte Sequenzanalysen 45

3.3. Genotypisierung mittels *Southern Blot* 45

3.3.1 Isolation von genomischer DNA 45

3.3.2 Restriktionsverdau und Elektrophorese 45

3.3.3 DNA-Transfer (Southern Blot) 45

3.3.4 Radioaktive Markierung der DNA-Sonden durch „random priming“ 46

3.3.5 Hybridisierung von Membranen 46

3.3.6 Entfernung radioaktiver Sonden von hybridisierten Membranen ("Strippen") 47

3.4 Northern Blot 47

3.4.1 Elektrophorese im denaturierenden Gel 47

3.4.2 RNA-Transfer (Northern Blot) 47

3.4.3 Radioaktive Markierung der Sonden 47

3.4.4 Hybridisierung der Membran 48

3.5 Allgemeine proteinchemische Methoden 48

3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 48

3.5.2 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE 48

3.5.3 Western Blot 49

3.5.4 Immundetektion 49

3.6 Arbeiten mit Hefe 49
3.6.1 Zum Prinzip des Yeast two-hybrid-Systems 49
3.6.2 Hefekulturen 50
3.6.3 Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA 50
3.6.4 Verpaarung von Hefen in kleinem Maßstab 51
3.6.5 Verpaarung mit dem prätransformierten Hefestamm 51
3.6.5 Berechnung der Verpaarungseffizienz 51
3.6.6 Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe 52
3.7 Expression von Glutathion S-Transferase (GST)- Fusions-proteinen 52
3.7.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in Escherichia coli 52
3.7.2 Aufreinigung des GST-Fusionsproteins 53
3.8 *In vitro* Transkription/Translation 53
3.9 GST-*pull-down* 54
3.9.1 Inkubation mit GST-Fusionsprotein 54
3.10 Expressionsanalyse mittels *Microarray*-Technologie 55
3.10.1 Isolation von RNA 55
3.10.2 RNA-Amplifizierung 55
3.10.3 Herstellung der Microarrays 56
3.10.4 Microarray-Hybridisierung 56
3.10.5 Scannen der Microarrays 57
3.10.6 Datenanalyse 57
3.11 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) 58
3.11.1 Reverse Transkriptase (RT-) PCR 58
3.11.2 RNase H Behandlung 58
3.11.3 Amplifikation der cDNA im LightCycler 58
3.11.4 Relative Quantifizierung 59
3.11.5 Statistische Auswertung 60
3.12 *In situ* Hybridisierung 60
3.12.1 Radioaktive Markierung der Sonde 60
3.12.2 Herstellung von Gefrierschnitten 61
3.12.3 Vorbehandlung der Gefrierschnitte 61
3.12.4 Hybridisierung der Gefrierschnitte 62
3.12.4 Waschen der Gefrierschnitte nach der Hybridisierung 62
3.12.4 Entwickeln 63

3.12.5 Kresyl-Violettfärbung 63

4 Ergebnisse 64

4.1 Ergebnisse der *Microarray*-Analyse 64

4.1.1 Expressionsanalyse der konventionellen und konditionalen CRH-R1 Mausmutanten 64

4.1.2 Vergleich der Expressionsprofile 67

4.1.3 Funktionelle Kategorisierung der differentiell regulierten Gene 69

4.1.4 Verifizierung der Microarray-Daten mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) 71

4.1.5 Weiterführende Expressionsanalyse ausgewählter Kandidatengene 78

4.1.6 Expressionsanalyse ausgewählter Kandidatengene nach Stress-erfahrung 80

4.1.7 CRH-abhängige Expression des RIKEN Klons 2610042L04 82

4.2 Ergebnisse der *Yeast two-hybrid*-Suche 85

4.2.1 Identifizierung potentieller Interaktionspartner der carboxy-terminalen cytoplasmatischen Domäne des CRH-R2 mit dem Yeast two-hybrid-System 85

4.2.2 Klonierung der C-terminalen Domäne des CRH-R2 85

4.2.3 Expression der C-terminalen Domäne des CRH-R2 in Hefe 85

4.2.4 Durchsuchen einer Yeast two-hybrid- cDNA Bibliothek nach Interaktionspartnern der C-terminalen Domäne des CRH-R2 86

4.2.5 Identifizierung falsch positiver Klone in der Hefe 87

4.2.6 Validierung der Protein-Protein Interaktion mit einer unabhängigen Methode 92

4.2.7 Expression der C-terminalen Domäne als GST-Fusionsprotein 93

4.2.8 GST-pull-down 95

5 Diskussion 99

5.1 Regionen-spezifische Genexpressionsanalyse der CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutanten mittels der *Microarray*-Technologie 99

5.1.1 Funktionelle Charakterisierung der differentiell exprimierten Kandidatengene in den CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutanten 99

5.1.2 Die Genexpressionsprofile der Hirnregionen im Vergleich 109

5.1.3 Microarray-Technologie als Methode zur Identifizierung CRH-abhängiger Signalmechanismen? 110

5.1.4 Möglichkeiten und Grenzen der Microarray-Technologie 112

5.1.5 Schlussfolgerung 114

5.2 Identifizierung und Charakterisierung von CRH-R2 Interaktoren 116

5.2.1 Identifizierung von Interaktionspartnern der C-terminalen Domäne des CRH-R2 mittels des Yeast two-hybrid-Verfahrens 116

5.2.2 Funktionelle Charakterisierung der Interaktionspartner 117

5.2.3 Schlussfolgerung 121

6 Anhang 122

6.1 Daten der *Microarray*-Analyse 122

6.2 Statistische Auswertung der qRT-PCR-Analysen 137

7 Literaturverzeichnis 138

Danksagung 164

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1	Regulation der HPA-Achse unter physiologischen Bedingungen.	***14***
Abbildung 1-2	Die Familie der CRH-Peptide und ihre Rezeptoren	***16***
Abbildung 1-3	Expressionsmuster von CRH-R1 und CRH-R2 mRNA in Sagitalschnitten des Nagetier	***18***
Abbildung 1-4	CRH-Rezeptor 1-abhängige intrazelluläre Signalkaskaden	***22***
Abbildung 3-1	Das *Yeast two-hybrid*-Prinzip	***51***
Abbildung 3-2	Analyse von Protein-Protein Interaktionen unter Verwendung des TNT-Sytems und GST-Fusionssystems	***55***
Abbildung 4.1-1 A	*Microarray*-Analyse des Hippokampus der konventionellen CRH-R1 Knockout-Mauslinie	***65***
Abbildung 4.1-1 B	*Microarray*-Analyse des Hippokampus der konditionalen CRH-R1 Knockout-Mauslinie	***65***
Abbildung 4.1-1 C	*Microarray*-Analyse der Amygdala der konditionalen CRH-R1 Knockout-Mauslinie	***66***
Abbildung 4.1-1 D	*Microarray*-Analyse des Hypothalamus der konditionalen CRH-R1 Knockout-Mauslinie	***66***
Abbildung 4.1-2	Übersicht der Funktionsklassen	***70***
Abbildung 4.1-3	Repräsentative Schmelzkurvenanalyse einer *real-time* PCR-Reaktion	***75***
Abbildung 4.1-4	Repräsentative Darstellung der Amplifikationskurven einer quantitativen real-time PCR-Reaktion	***75***
Abbildung 4.1-5	qRT-PCR Verifizierung der *Microarray*-Daten.	***77***
Abbildung 4.1-6	*In situ* Expressionsanalyse von Rap2ip und Fyco1 im Hippocampus der CRH-$R1^{+/+}$ (Wildtyp) und CRH-$R1^{-/-}$ (Knockout) Mauslinie	***79***
Abbildung 4.1-7	*Northern Blot* Analyse von Rab6	***80***
Abbildung 4.1-8	qRT-PCR Analyse der Genexpression des RIKEN Klons 2610042L04 nach Stresserfahrung	***82***
Abbildung 4.1-9	*Northern Blot* Analyse der Expression des Riken Klon 2610042L04 in AtT-20 Zellen	***83***
Abbildung 4.1-10	Quantifizierung der Expression des RIKEN Klons 2610042L04 in AtT-20 Zell nach CRH-Behandlung	***83***

Abbildung 4.2-1	Restriktionsanalyse der Bibliotheksplasmide durch Verdau mit *Eco*RI und *Xho*I	***87***
Abbildung 4.2-2	Verpaarungseffizienz nach Wiederverpaarung ausgewählter Hefekolonien	***89***
Abbildung 4.2-3	Verifizierte Interaktionpartner der C-terminalen Domäne des CRH-R2 in der Hefe	***90***
Abbildung 4.2-4	Analyse der Expression von GST und GST_cy2 Fusionsprotein in *E. coli*	***94***
Abbildung 4.2-5	Analyse der Expression des GST-Fusionsproteins mittels Western Blot und Immundetektion	***95***
Abbildung 4.2-6	Graphische Darstellung der Genstruktur der potentiellen Interaktionspartner.	***96***
Abbildung 4.2-7	*In vitro* Translation der potentiellen Interaktionspartner.	***97***
Abbildung 4.2-8	GST-*pull-down*	***98***
Abbildung 5.1-1	Schematische Darstellung der differentiell exprinierten Kandidatengene und deren Funktionen	***101***
Abbildung 5.2-1:	Vergleich der Aminosäuresequenz der C-terminalen Sequenz des CRH-Rezeptors 1 und 2	***116***
Abbildung 5.2-2	Vergleich der C-terminalen Aminosäurensequenz des *Parathyroid-Hormon*-Rezeptors (PHT1R) mit des CRH-R1 und CRH-R2	***118***
Tabelle 1-1	Auswirkungen der Veränderung zentraler CRH-Konzentration	***22***
Tabelle 4.1-1	Regionen der CRH-R1 Mausmutanten, die mit der *Microarray*-Technologie miteinander verglichen wurden	***64***
Tabelle 4.1-2	Zusammenfassung der signifikant veränderten Genexpression der jeweiligen Hirnregion	***67***
Tabelle 4.1-3	Vergleich der Genexpressionsprofile	***68***
Tabelle 4.1-4	Klassifizierung der Kandidatengene	***71***
Tabelle 4.1-5	Übersicht differentiell exprimierter Gene in CRH-R1 Mausmutanten in verschiedenen Regionen	***72***
Tabelle 4.1-6	qRT-PCR Analyse verifizierter Gene im Hippokampus	***78***
Tabelle 4.2-1	Übersicht der Kolonien der *Yeast two-hybrid*-Suche	***87***
Tabelle 4.2-2	Identifizierung der in Hefe verifizierten Interaktoren	***91***

Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	*3'-untranslated region*
5'-UTR	*5'-untranslated region*
AC	Adenylatcyclase
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
Aldoc	Aldolase C
Amb	Nucleus ambiguus
AON	Anteriorer olfaktorischer Nukleus
Apit	*Anterior pituitary* (Hypophyse)
ARC	Arcuate nuclei
AVP	Arginin Vasopressin
Basal G	Basalganglien
BLA	Basolateraler Nukleus der Amygdala
BNST	*Bed nucleus of the stria terminalis*
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
CamKIIα	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CC	Corpus callosum
cDNA	*complementary* DNA
Cereb	Cerebellum
CeA	zentraler Nukleus der Amygdala
Clstn3	*Calsyntenin-3*
CingCx	Cortex cinguli
CoA	cortikaler Nukleus der Amygdala
CP	*Choroid plexus*
Cpe	Carboxypeptidase E
Cpeb3	*Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3*
cpm	*counts per minute*
CRH	*Corticotropin-releasing hormone*, Corticotropin-freisetzendes Hormon
CRH-R1	CRH-Rezeptor 1
CRH-R2	CRH-Rezeptor 2
CREB	cAMP *response element binding protein*
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
C_T	*Threshold cycle*
Ctx	Cortex
DBB	*Diagonal band of Broca*
Deep N	*deep nuclei*
DEPC-H_2O	Diethylpyrocarbonat-behandeltes H_2O
DG	*Dentate gyrus*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
dNTP	Deoxynukleotidetriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Enpp2	*Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 2*
ERK	*Extracellular signal-regulated kinase*
EST	*Expressed sequence tag*
FGF	*Fibroblast growth factor*
For primer	*Forward primer*
FrCx	Frontaler Cortex
Fyco1	*FYVE and coiled-coil domain containing 1*
GAL4-AD	GAL4-Aktivierungsdomäne
GAL4-DNA-BD	GAL4-DNA-Bindungsdomäne
GDP	Guanosin-diphosphat
Gnb2	*Guanine nucleotide binding-protein, beta-2 subunit*
GPCR	*G-protein-coupled receptor*
GRE	Glucocorticoid *response element*
GRK3	G-Protein-Rezeptorkinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GTPasen	Guanosin-Triphosphatasen
h	*Hour*
HPA	*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*
Hprt	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl

	Transferase
HRP	*Horse-radish-peroxidase*
IC	*Inferior colliculi*
icv	Intracerebral ventrikulär
IO	*Inferior olive*
IPit	*Intermediate pituitary* (Hypophyse)
IPTG	Isopropyl b-D Thiogalaktosid
JNK	*c-Jun NH2-terminal kinase*
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
KO	Knockout
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	Locus coeruleus
LDTg	*Lateraldorsal tegmental nuleus*
loxP	*Location of crossover*
LS	Laterales Septum
M	molar
MA	Medialer amygdaloider Nukleus
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
Mbp	*Myelin basic protein*
min	Minute
mRNA	*messenger* RNA
MS	Mediales Septum
NaAc	Natriumacetat
Nmnat-2	Nicotinamide 5´-Mononukleotid Adenylyltransferase 2
NTS	Nucleus tractus solitarii
OB	olfaktorischer Bulbus
OccCx	Occipital cortex (okzipitaler Cortex)
OD	Optische Dichte
Oxr1	Oxidation resistance 1
pA	Polyadenylierungssignal
PAG	Periaquäduktales Grau
Pak	*p21-activated Kinase*
ParCx	Parietaler Cortex
PCR	*Polymerase chain reaction*
PFA	Paraformaldehyd
Pgd	Prostaglandin
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3 Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Plp	Proteolipid Protein
Pllp	Plasmamembran Proteolipid
PMT	*Photomultipler tube*
POMC	Proopiomelanocortin
PPit	*Posterior pituitary* (Hypophyse)
PPTg	*Pedunculopontine tegmental nucleus*
PSD-P5	*Postsynaptic density*-95
Ptgds	Prostaglandin-D2 Synthase
PHTR	*Parathyroid-Hormone*-Rezeptoren
PVN	Paraventrikulärer Nucleus
qRT-PCR	quantitative *real-time* PCR
R	*Red nucleus*
Rap2ip	*Rap2 interacting protein*
Rev primer	*Reverse Primer*
Rgs4	*Regulator of G-protein signaling 4*
RN	Raphe nuclei
RNA	*Ribonucleic acid*
rpm	*Rounds per minute*
RSP	*Regulated secretory pathway*
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SC	Superior colliculi
SD	*synthetic dropout* (synthetisch definiertes Minimalmedium für Hefen)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SN	Substantia nigra
SON	Supraoptic nucleus
Sorl1	*Sortilin-related receptor*

SP5n	Spinal trigeminus nucleus
Sypl	*Synaptophysin-like protein* bzw. Pantophysin
TAE	Tris-acetate-EDTA
TBE	Tris-borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEA	Triethanolamin
Thal	Thalamus
Tm4sf11	*Transmembrane 4 subfamily 11*
TMD	Transmembrandomäne
tRNA	Transfer RNA
Tris	Tris-(Hydroxylmethyl-) aminomethan
Ttr	Transthyretin
U	Unit
UAS	*upstream activating sequence*
UCN	Urocortin
V	Volt
v/v	Volumen pro volumen
VL	ventral lateraler Nukleus des Thalamus
VMH	ventral medialer Nukleus des Hypothalamus
YPDA	Vollmedium für Hefen mit Zusatz von Adenin
YTH	*Yeast two-hybrid*
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid

Zusammenfassung

Externe oder interne Stressoren erfordern vom Organismus zur Aufrechterhaltung der Homöostase eine Anpassungsreaktion, die letztendlich das Überleben eines Individuums gewährleistet. Chronischer Stress oder die Unfähigkeit eines Individuums Stress adäquat zu verarbeiten, kann neben Störungen kardiovaskulärer und metabolischer Funktionen und der Schwächung des Immunsystems, auch zu psychischen Störungen führen.

Das *Corticotropin releasing hormone* (CRH) und die CRH-Rezeptoren (CRH-R) passen den Körper an eine Stressreaktion an, indem sie physiologische Parameter wie die Blutglucosekonzentration, den Herzschlag, die Atemfrequenz sowie den Blutdruck verändern und verhaltensspezifische Reaktionen beeinflussen. Ein Vielzahl von klinischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine Dysregulation dieses Systems mit der Entstehung von psychiatrischen Störungen wie der Depression in Verbindung steht. Es ist daher von besonderem Interesse, die grundlegenden molekularen und zellulären Mechanismen, die durch die CRH-Rezeptoren reguliert werden, aufzuklären, um die Rolle des CRH-Systems bei der Entstehung dieser Krankheiten zu verstehen. Mausmutanten, bei denen der CRH-R1 konstitutiv (CRH-$R1^{-/-}$) oder aber nur konditional in Vorderhirnstrukturen (CRH-$R1^{loxP/loxP}$CamKIIα-Cre) ausgeschaltet wurde, repräsentieren nützliche Modelle, um dieser Frage nachzugehen.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen mittels der *Microarray*-Technologie die Veränderung des Genexpressionsprofils zu analysieren, welches durch CRH-R1-Deletion in diesen Mausmutanten hervorgerufen wurde. Mit dieser Methode sollten neue Kandidatengene identifiziert werden, die in CRH-R1-abhängigen Signaltransduktionskaskaden involviert sind. Zum anderen sollte außerdem auf Proteinebene nach direkten Interaktionspartnern der C-terminalen Domäne des CRH-R2 mittels des *Yeast two-hybrid*-Systems gesucht werden.

Gegenstand der *Microarray*-Analyse waren der Hippokampus und die Hypophyse der CRH-$R1^{-/-}$ Mausmutanten sowie der Hippokampus, die Amygdala und der Hypothalamus der konditionalen CRH-$R1^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre Mausmutanten.

Es konnten insgesamt 564 Gene identifizieren werden, die nach unseren statistischen Kriterien signifikant differentiell exprimiert wurden. Wir konnten insgesamt 16 dieser Kandidatengene mit quantitativer *real-time* PCR erfolgreich verifizieren. Mit 303 Genen war das Genexpressionsprofil der Amgydala am stärksten verändert, in den anderen Regionen waren zwischen 47 und 89 Gene reguliert. Es konnten relativ wenige Übereinstimmungen zwischen den untersuchten Regionen und den Mausmutanten beobachtet werden. Die

Einteilung dieser Kandidaten in Funktionsklassen ergab ein weites Spektrum verschiedener Kategorien, wobei Gene, die an metabolischen Prozessen, Transport sowie Translations- und Transkriptionsvorgängen beteiligt sind, am stärksten vertreten waren. Im Hippokampus der konventionellen Mausmutante konnten mit dem Rap2 *interacting protein* und Fyco1 zwei Kandidaten identifiziert werden, die an intrazellulären Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind und bisher noch nicht im Zusammenhang mit CRH-R1-abhängigen Signalmechanismen beschrieben wurden. Interessanterweise konnten wir dort auch die Veränderung der Expression von Genen beobachten, die in Myelinisierungsprozesse involviert sind. Ein weiterer Kandidat, der sowohl im Hippokampus als auch in der Amygdala der konditionalen Knockout-Mäuse identifiziert werden konnte, ist der RIKEN Klon 2610042L04. Wir konnten zeigen, dass dieser Kandidat auch durch CRH-Behandlung in AtT-20 Zellen und nach Stresserfahrung in den Mausmutanten reguliert wird. Andere Kandidaten, die bisher nicht im Zusammenhang mit CRH-R1-abhängiger Aktivierung gezeigt wurden, sind zum Beispiel *Oxidation resistance 1* und *Sortilin-related receptor 1*.

Die differentielle Expression der hier identifizierten Gene könnte mit den neuroendokrinologischen und verhaltensspezifischen Veränderungen in Verbindung stehen, die bei den CRH-R1-Mausmutanten beobachtet werden konnten, obwohl diese nur bedingt als direkte Zielmoleküle des Rezeptors betrachtet werden sollten. Die nähere funktionelle Charakterisierung solcher Kandidatengene kann es uns ermöglichen, Einblicke in bisher nicht identifizierte CRH-R1-abhängige Signalkaskaden zu gewinnen.

Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung CRH-R-abhängiger Signaltransduktionsmechanismen und Teil dieser Arbeit war es, direkte Interaktionspartner der C-terminalen Domäne des CRH-R2 mit Hilfe des *Yeast two-hybrid*-Verfahrens zu identifizieren. Vier Klone konnten unabhängig *in vitro* mit einem GST-*pull-down*-Experiment als potentielle Interaktionspartner verifiziert werden: Carboxypeptidase E (Cpe), *Guanine-nucleotide binding protein beta* 2 (Gnb2), *Pantophysin* und der RIKEN Klon 2310057D15. Eine funktionelle Charakterisierung dieser Kandidaten weist auf eine mögliche Involvierung von Gnb2 bei der Aktivierung alternativer Signalkaskaden durch den Rezeptor hin. Desweiteren ergab die Analyse, dass Cpe und Pantophysin beim intrazellulären Transport des CRH-R2 eine Rolle spielen könnten und damit möglicherweise die Verfügbarkeit des Rezeptors regulieren. Eine konkrete Aussage über die funktionelle Bedeutung dieser Interaktionen bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Stressdefinition

Hans Selye, einer der Pioniere in der Erforschung der Grundlagen der Physiologie und Pathophysiologie von Stress, definierte Stress als „nichtspezifische Reaktion des Körpers auf jede an ihn gestellte Anforderung“ (Selye, 1976). Konfrontation mit verschiedenen Stressoren führt zur Aktivierung des Stresssystems im Körper und damit zu physischen und verhaltensspezifischen Veränderungen, der sogenannten generellen Adaption, die die Überlebenschancen des Individuums verbessern soll. Zu den Adaptionen des Verhaltens zählen verstärkte Wachsamkeit, verbesserte Wahrnehmung, Erhöhung der Schmerzunempfindlichkeit und der Körpertemperatur. Vegetative Funktionen wie Appetit, Nahrungsaufnahme, Sexualverhalten und Schlaf werden hingegen unterdrückt. Gleichzeitig finden physische Anpassungen wie die Verstärkung von kardiovaskulären Funktionen, Atmung und Metabolismus statt, die der Verlagerung des Energiehaushaltes und damit der Bereitstellung von notwendigen Substanzen dienen (Chrousos, 1998).

1.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-Achse

1.2.1 Die Regulation der HPA-Achse unter physiologischen Bedingungen

Eines der wichtigsten neuroendokrinen Systeme des Körpers, welches in Folge einer Stressreaktion aktiviert wird, ist die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (***H**ypothalamic-**P**ituitary-**A**drenocortical Axis*, HPA-Achse). Unter physiologischen Bedingungen wird das HPA-System durch externe oder interne Stressoren aktiviert, um den erhöhten Energiebedarf, u.a. durch Freisetzung von Glukose, erhöhten Blutdruck, verstärkte Aufmerksamkeit, zu regulieren (Abbildung 1-1).

Eines der Schlüsselpeptide der HPA-Achse ist das Corticotropin-freisetzende Hormon (***C**orticotropin **R**eleasing **H**ormone*, CRH), ein Peptid bestehend aus 41 Aminosäuren, welches 1981 von W. Vale erstmalig isoliert werden konnte (Vale et al., 1981). Während einer Stressreaktion setzen Neurone des paraventrikulären hypothalamischen Nukleus CRH frei, welches dann über die portalen Blutgefäße zur anterioren Hypophyse transportiert wird.

Die darauf folgende Aktivierung des CRH-Rezeptors 1 (CRH-R1) führt zur verstärkten Transkription von Proopiomelanocortin (POMC) und zur Freisetzung von POMC-Derivaten, wie dem adrenocorticotrophen Hormon (ACTH) und β-Endorphin, aus den corticotrophen Zellen der Hypophyse. Die Effekte von CRH werden dort durch Vasopressin (AVP) verstärkt, welches nach anhaltendem Stress von den paraventrikulären Neuronen koexprimiert und sezerniert wird (Sawchenko et al., 1984). ACTH stimuliert dann die Freisetzung von Glucocorticoiden (Cortisol beim Primaten, Corticosteron bei Nagern) aus der Zona fasciculata der Nebennierenrinde in den Blutkreislauf. Glucocorticoide steuern verschiedene physiologische Reaktionen, um den Körper auf die akute Stressreaktion vorzubereiten. Sie aktivieren energiemobilisierende Prozesse wie Glycogenolyse, Proteolyse und Lipolyse und verstärken kardiovaskuläre Prozesse. Desweiteren können Corticosteroide Emotionen und kognitive Prozesse, wie Lernen und Gedächtnis, beeinflussen (Sapolsky et al., 2000; Korte, 2001). Sie spielen außerdem eine Schlüsselrolle bei der Regulation der HPA-Achsen-Aktivität. Über einen inhibitorischen Rückkopplungsmechanismus beenden sie die Stressreaktion des Körpers indem sie auf extrahypothalamische Zentren wie Hippokampus und frontalen Cortex sowie Hypothalamus und Hypophyse wirken (Jacobson & Sapolsky 1991; De Kloet, 1995).

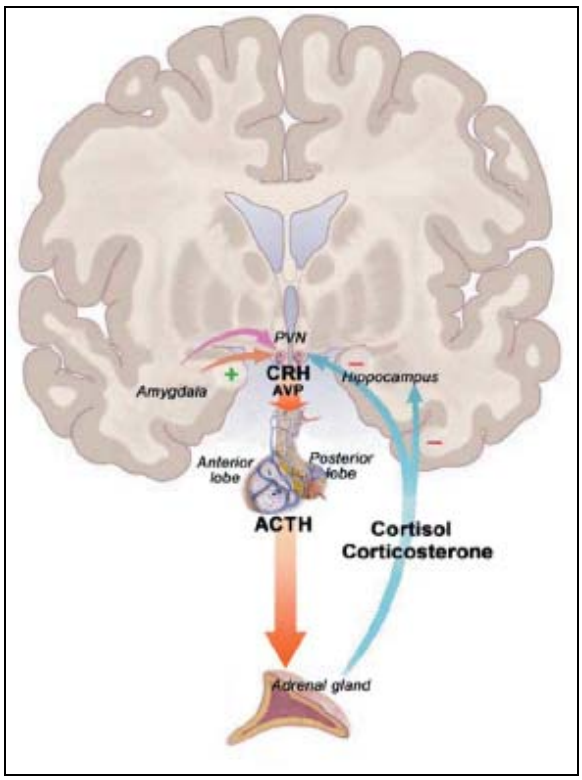


Abbildung 1-1: Regulation der HPA-Achse unter physiologischen Bedingungen.
Im paraventrikulären Nukleus des Hypothalamus (PVN) verarbeiten die CRH-positiven Neurone stressrelevante Informationen, die von exzitatorischen afferenten Nervenbahnen der Amygdala und inhibitorischen Afferenzen des Hippokampus eintreffen. Das sezernierte CRH aktiviert die Freisetzung von ACTH aus der anterioren Hypophyse, welches wiederum die Sekretion von Glucocorticoiden aus der Nebenniererinde stimuliert. Die Effekte von CRH in der Hypophyse werden durch AVP verstärkt. Die Glucocorticoide kontrollieren die Aktivität der HPA-Achse dann direkt indem sie über einen negativen Rückkopplungsmechnismus die Freisetzung von CRH im PVN regulieren.
(Abbildung nach Nestler et al., 2002)

1.2.2 Die Familie der CRH-verwandten Neuropeptide und ihre Rezeptoren

Das Corticotropin-freisetzende Hormon wird aus einem 196 Aminosäuren langem Prä-Pro-Peptid durch proteolytische Prozessierung in seine biologisch aktive Form - bestehend aus 41 Aminosäuren - prozessiert (Vale et al., 1981). In den letzten Jahren konnten weitere Mitglieder der CRH-Peptidfamilie identifiziert werden, hierzu zählen Urocortin I (UCNI), Urocortin II bzw. Stresscopin-verwandtes Peptid (UCNII) und Urocortin III bzw. Stresscopin (UCNIII) (Vaughan et al., 1995; Hsu et al., 2001) (Abbildung 1-2). Diese Peptide werden in verschiedenen Strukturen des zentralen Nervensystems und peripheren Geweben exprimiert. CRH und seine verwandten Peptide aktivieren die Rezeptoren CRH-R1 und CRH-R2, die zur Klasse II der Superfamilie der G-Protein gekoppelten oder auch Secretin-ähnlicher 7-Transmembranrezeptoren gehören. CRH-R1 und CRH-R2 werden von zwei verschiedenen Genen kodiert und besitzen mehrere Spleißvarianten (Reul und Holsboer, 2002; Grammatopolous, 2002). Durch alternatives Spleißen von CRH-R1α entstehen die Isoformen CRH-R1β und CRH-R1c-h, die entweder durch Insertionen von zusätzlichen Aminosäuren in den intrazellulären Schleifen oder verschiedenen Deletionen im N-Terminus oder in den Transmembrandomänen charakterisiert sind. Die Funktion dieser CRH-Rezeptor-Varianten konnte bisher aber noch nicht aufgeklärt werden (Ross et al., 1994; Grammatopoulos et al., 1999; Pisarchik und Slominski, 2001). Für den CRH-R2 existieren drei funktionelle Spleißvarianten (α, β und γ) beim Menschen und zwei in der Ratte (α und β), die sich in ihrer N-terminalen Sequenz unterschieden. Bei Nagetieren wird CRH-R2α hauptsächlich im zentralen Nervensystem und CRH-R2β vorwiegend in peripheren Geweben exprimiert. Die pharmakologischen Eigenschaften dieser Isoformen unterscheiden sich aber nicht wesentlich (Lovenberg et al., 1995; Perrin et al., 1995).

In ihrer Aminosäuresequenz sind die CRH-Rezeptoren 1 und 2 zu 70 % identisch, wobei die Transmembrandomänen und intrazellulären Schleifen die höchste Homologie aufweisen.

CRH-R1 und CRH-R2 unterscheiden sich auch in ihrer Affinität zu den Liganden CRH, UCN1, UCN2 und UCN3 (Chalmers et al., 1996; Donaldson et al., 1996; Lovenberg et al., 1995). Während CRH mit 10-fach höherer Affinität an CRH-R1 bindet, besitzt Urocortin etwa die gleiche Affinität für beide Rezeptoren. UCN2 und UCN3 hingegen binden ausschließlich an den CRH-R2.

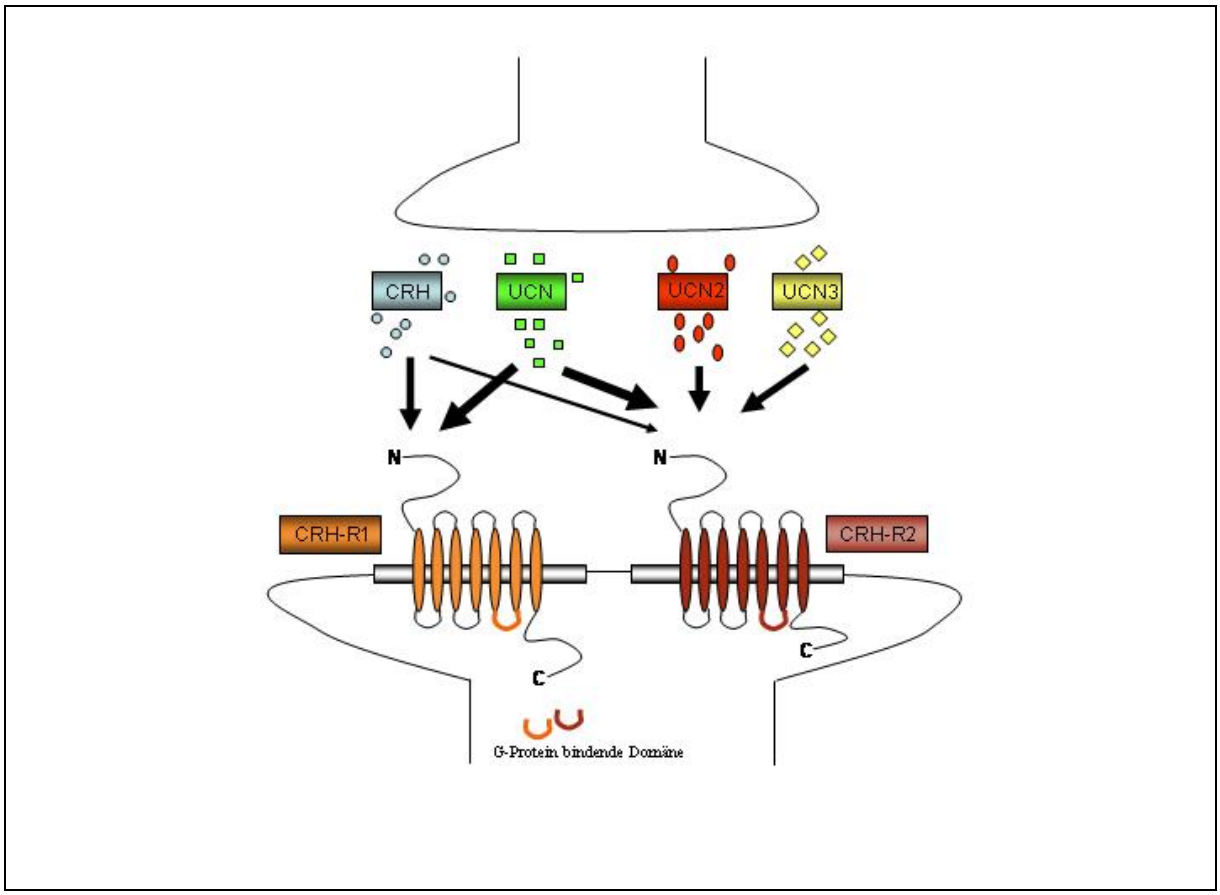


Abbildung 1-2: Die Familie der CRH-Peptide und ihre Rezeptoren.
Die Pfeile repräsentier die Liganden-Rezeptor-Interaktionen. Die Stärke der Pfeile reflektiert die relativen Bindungsaffinitäten.

CRH-R1 und CRH-R2 besitzen ein unterschiedliches aber teilweise überlappendes Expressionsmuster (Abbildung 1-3). CRH-R1 wird im Gehirn und in der Hypophyse weit verbreitet exprimiert, mit höchster Dichte in der anterioren Hypophyse, im cerebralen Cortex, im Cerebellum, in der basolateralen Amygdala, im Hippokampus, im medialen Septum und im olfaktorischen Bulbus. Die basale Expression von CRH-R1 im paraventrikulären Nukleus ist sehr gering, kann dort aber durch Stress oder CRH-Mikroinfusion (und das nur in der Ratte nicht aber in der Maus) induziert werden (Imaki et al., 2003; 2001; Konishi et al., 2003). In der Peripherie ist der CRH-R1 nur gering im Testis, den Ovarien und der Nebenniere exprimiert. Die Spleißvarianten des CRH-R2 unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster, wobei CRH-R2α im Gehirn dominiert und CRH-R2β vorwiegend in der Peripherie exprimiert wird. CRH-R2α wird im Hypothalamus, im lateralen Septum, im Bed Nukleus der Stria terminalis (BNST), im mesencephalischen Raphe Nukleus, in der medialen Amygdala, im Hippokampus und in der Retina exprimiert. Die Expression von CRH-R2β beschränkt sich im Gehirn auf nicht-neuronale Gewebe wie dem Plexus Choroidei, wird aber in peripheren

Geweben, wie den Kardiomyocyten des Herzens, dem Gastrointestinaltrakt, der Lunge, den Ovarien und den Skelettmuskeln, verstärkt exprimiert (Lovenberg et al., 1995).

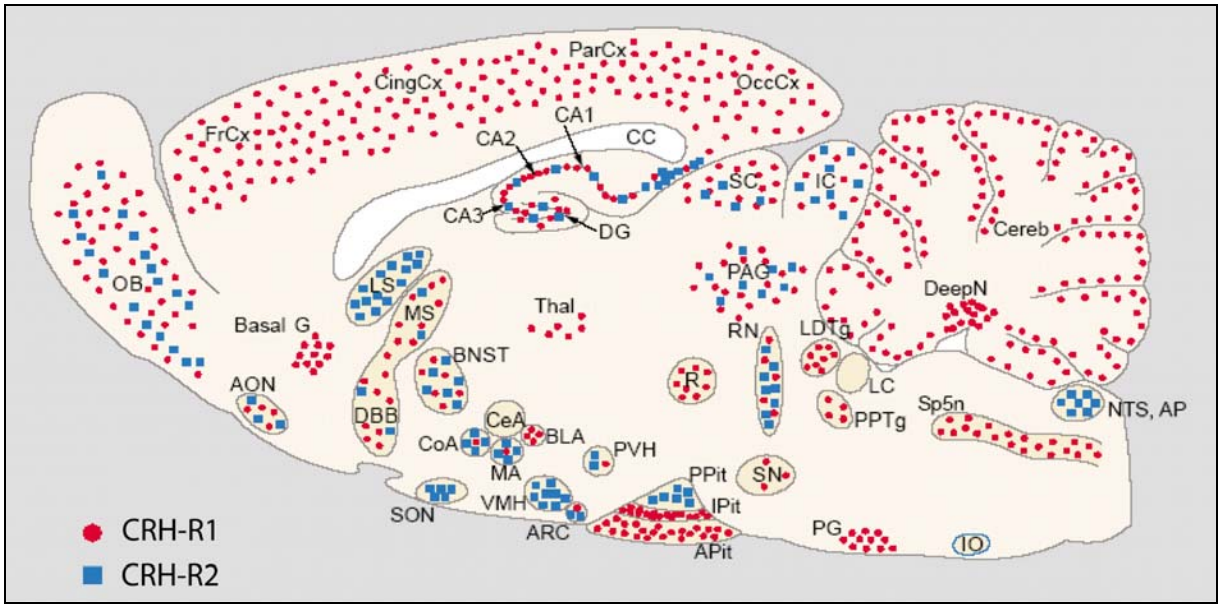


Abbildung 1-3. Expressionsmuster von CRH-R1 und CRH-R2 mRNA in Sagitalschnitten des Nagetiers. Die mRNA Verteilung basiert auf *in situ* Hybridisierungsstudien bei Maus und Ratte (Chalmers et al., 1995; Bittencourt & Sawchenko et al., 2000; Van Pett et al., 2000). Der dargestellte sagitale Schnitt ist neuroanatomisch nicht exakt. Abkürzungen sind im Anhang erläutert. (Nach Reul und Holsboer, 2002)

1.2.3 Spezielle Funktionen des CRH-Systems

Das CRH-System vermittelt nicht nur die neuroendokrine Stressreaktion, sondern aktiviert auch autonome und verhaltenspezifische Reaktionen bei stressreichen Ereignissen.

CRH spielt eine entscheidende Rolle bei der Stressadaption des Körpers, in dem es als neuroendokriner Stressmediator die Aktivierung des HPA-Systems initiiert. Eine hohe Dichte CRH-immunoreaktiver Neurone befindet sich im anterioren und medial-dorsalen Bereich des paraventrikulären hypothalamischen Nukleus, der über das Pfortadersystem mit der anterioren Hypophyse verbunden ist und über die CRH-Ausschüttung das HPA-System aktivieren.

Unabhängig von dieser Rolle als Stresshormon weist die Distribution von CRH-spezifischen Neuronen im Gehirn außerhalb des Hypothalamus auch auf eine Funktion als Modulator der neuronalen Aktivität anderer Hirnregionen hin. In hoher Dichte wird CRH hier im Neocortex, im zentralen Nukleus der Amygdala, im BNST, im Hippokampus, im Nukleus Accumbens, im thalamischen Nukleus, in der Substantia Nigra, im Raphe Nukleus, im Locus Coeruleus, im Periaqueduktalem Grau und im Cerebellum exprimiert (Swanson et al., 1983; Van Bockstaele et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass CRH auch eine Reihe von verhaltensspezifischen und physiologischen Veränderungen hervorrufen kann. Wird CRH in

das zentrale Nervensystem von Versuchstieren verabreicht, so kann man eine Reihe von Veränderungen beobachten, die dem Verhalten während einer Stressreaktion ähnlich sind, u.a. Veränderungen im autonomen Nervensystem, Einschränkungen im lokomotorischen Verhalten, der Futteraufnahme und sowie dem Sexualverhalten (Dunn and Berridge, 1990; Spina et al., 2000).

In seiner Funktion als Neurotransmitter beeinflusst CRH die Eigenschaften von Neuronen, indem es synaptische Transmissionen oder die Erregbarkeit von Neuronen verändert (Aldenhoff et al., 1983; Rainnie et al., 1992; Fox und Gruol, 1993; Smith und Dudek, 1994; Liu et al., 2004). Aktuelle Studien zeigen, dass CRH *in vivo* synaptische Funktionen im Hippokampus der Ratte verstärkt (Wang et al., 2000), eine Zunahme des "*Spikings*" von hippokampalen Pyramidalzellen bewirkt (Aldenhoff et al., 1983) und die Amplitude sogenannter "*Populationsspikes*" von CA1 Neuronen erhöht (Hollrigel et al., 1998). Eine weitere Funktion von CRH wird außerdem bei der Entstehung von Langzeit-Potenzierung sowie Langzeit-Depression impliziert (Wang et al., 2000; Bishop, 2002; Blank et al., 2002; Miyata et al., 1999), Mechanismen, die als Modelle für Lernen und Gedächtnis gelten. CRH spielt auch eine Rolle bei der Modulierung Gedächtnis-bildender Prozesse, so beeinflusst es das Lernverhalten als Reaktion auf Angstkonditionierung (Radulovic et al., 1999) oder verstärkt Hippokampus-abhängiges Lernen (Zorilla et al., 2002).

Eine weitere Bedeutung wird CRH auch bei der Entwicklung, Reifung und Differenzierung von Neuronen beigemessen (Cibelli et al. 2001; Swinny et al., 2004). Zahlreiche Studien zeigen außerdem, dass CRH sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Eigenschaften besitzt (Craighead et al., 2000; Lezoualc'h et al., 2000; Lyons et al., 1991; Fox et al., 1993; Strijbos et al., 1994; Maecker et al., 1997; Roe et al., 1998). Bayatti und Mitarbeiter konnten zeigen, dass CRH abhängig von der Konzentration und der Hirnregion Unterschiede in seinen neuroprotektiven Eigenschaften zeigt (Bayatti et al., 2003). In hippokampalen neuronalen Zellen konnte beobachtet werden, dass CRH vor durch oxidativen Stress induzierten Zelltod schützt (Lezoualc'h et al., 2000). Andere Studien wiederum beschreiben, dass CRH in Prozesse involviert ist, die zum neuronalen Zelltod führen oder *in vitro* Apoptose induzieren (Chan et al., 1996; Lyon et al., 1991; Dermatzki et al., 2002). Weitere Studien sind erforderlich, um die kontroverse Rolle von CRH bei diesen Prozessen aufzuklären.

Verglichen mit der Anzahl der Studien, die die Funktion der Rezeptoren behandeln, gibt es relativ wenige Informationen über die Regulation des Rezeptors an sich. Bekannt ist, dass in AtT-20 Zellen, die anhaltend mit CRH stimuliert wurden, cAMP in der Zelle akkumuliert, ACTH freigesetzt wird und die mRNA des Rezeptors herunterreguliert wird (Hauger und

Dautzenberg, 1999). Dieser Regulationsmechanismus konnte auch in Zellen der anterioren Hypophyse beobachtet werden, die mit CRH stimuliert wurden (Pozolli et al., 1996). Im Gegensatz dazu konnte in verschiedenen Zelllinien homologe Desensibilisierung des CRH-R1 beobachtet werden, ohne dass die Expression der mRNA verändert war (Hauger et al., 1997). Die Signalaktivität der meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird über diesen Mechanismus reguliert, bei der die Rezeptoren phosphoryliert werden und durch eine Interaktion mit Arrestinen desensibilisiert und von den G-Proteinen gelöst werden, gefolgt durch die Internalisierung des Rezeptors (Freedman et al., 1996; Claing et al., 2002). Es wird angenommen, dass die durch G-Protein Rezeptorkinase 3 (GRK3) vermittelte Phosphorylierung des CRH-R1 in diesen Prozess involviert ist und spezifische Aminosäuren im carboxyterminalen Teil des Rezeptors entscheidend sind (Teli, et al., 2005; Dautzenberg et al., 2002). Die Mechanismen, die der Regulation der CRH-R2 Expression zugrunde liegen, wurden bisher noch nicht untersucht.

1.2.4 CRH-abhängige Signaltransduktionwege

In Anbetracht der Tatsache, dass CRH und verwandte Peptide in eine Vielzahl allgemeiner physiologischer und im besonderen neuroendokriner sowie verhaltenspezifischer Prozesse involviert sind, ist es wahrscheinlich, dass diese Diversität nur durch die Aktivierung multipler Signalkaskaden entsteht.

Es ist bekannt, dass eine Bindung der Liganden an die extrazellulären Domänen der CRH-Rezeptoren zu deren Konformationsänderung in der Membran und damit zu einer Erhöhung der Affinität für G-Proteine führt (Abbildung 1-4). In den meisten, wenn auch nicht in allen Geweben, führt dies zu einer Aktivierung der α-Untereinheit stimulatorischer G-Proteine ($G\alpha_s$), die dann die Adenylatzyklase aktiviert und damit zur Erhöhung von cAMP in der Zelle führt. cAMP bewirkt eine Dissoziation der katalytischen und regulatorischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), die wiederum andere regulatorische Proteine im Cytoplasma phosphoryliert oder im Zellkern Gentranskription durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren aktiviert (Dautzenberg et al., 2002; Grammatopolous und Chrousos, 2002). In bestimmten Geweben können CRH-Rezeptoren auch alternative Signalkaskaden aktivieren, in dem sie andere Gα-Untereinheiten stimulieren. Blank et al. konnten zum Beispiel zeigen, dass im Hippokampus von Balb/c und C57BL/6N Mäusen, eine unterschiedliche Aktivierung von Gq11 beziehungsweise Gs, Gq/11 und Gi entweder die PKA- oder die PLC/PKC- abhängige Signalkaskade stimuliert und damit neuronale Aktivität

beeinflusst (Blank et al., 2003). Unabhängig davon kann die βγ-Untereinheit selbst auch andere Effektoren aktivieren (Brar et al., 2003). Durch differentielle G-Protein-Aktivierung können CRH und ähnliche Peptide multiple Signalkaskaden aktivieren und damit unterschiedliche Antworten in den Zellgeweben hervorrufen. Tatsächlich modulieren CRH-Rezeptoren ein große Anzahl von intrazellulären Proteinkinasen, wie Proteinkinase A, Proteinkinase B/Akt, Proteinkinase C und die p42/p44 und p38 Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAP Kinasen, MAPK), aber auch andere wichtige Signalmoleküle wie Calcium, Nitritoxid Synthase, Guanylyl Zyklase und Fas Ligand (Aggelidou et al., 2002; Dermatzki et al., 2002; Kiang, 1997; Cantarella et al., 2001; Makrigiannakis et al., 2001, Kostic et al., 2001). Der genaue Mechanismus, der die CRH-Rezeptoren befähigt, verschiedene Signalkaskaden zu aktivieren, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Die alternative Aktivierung des Phospholipase C/ Proteinkinase C-Kaskade wurde in Leydig Zellen (Ulisse et al., 1999), in Astrozyten (Takuma et al., 1994), im Myometrium (Grammatopoulos et al., 2000) und im Cerebellum (Miyata et al., 1999) der Ratte beschrieben.

Mehrere Studien haben außerdem die CRH-R1-abhängige Stimulation der MAPK-Kaskade untersucht, im speziellen die der extrazellulär regulierten Kinasen 1/2 (***E**xtracellular Signal-**R**egulated **K**inases*, ERKs). Aktuelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese CRH-Rezeptor-induzierte Aktivierung liganden- und gewebsspezifisch und vom Rezeptorsubtyp abhängig sein kann. So werden zum Beispiel in Zelllinien wie den AtT-20 Zellen oder den Y79 Neuroblastoma Zellen die ERKs abhängig von der Adenylatzyklase/ Proteinkinase A durch CRH und UCN aktiviert (Kovalovsky et al., 2000; Radulovic et al., 2003). In myometrialen Zellen oder in HEK293 Zellen hingegen, in denen der CRH-R1 überexprimiert wurde, ist die Aktivierung Proteinkinase C-abhängig und erfolgt nur über UCN und nicht über CRH (Grammatopoulus et al., 2000). Refojo und Mitarbeiter konnten eine Regionen-spezifische Aktivierung von ERK 1 und 2 in der CA3 und CA2 Region des Hippokampus und im basolateralen Komplex der Amygdala *in vivo* nachweisen (Refojo et al., 2005). Durch spezifische Aktivierung der ERKs können auch unterschiedliche physiologische Reaktionen der Zellen stimuliert werden. Im Herz vermitteln die ERKs UCN-induzierten Schutz vor ischämischen Schäden (Brar et al., 2000), im Hippokampus hingegen sind die ERKs in die neuroprotektiven Effekte von CRH und UCN nach oxidativen und exzitatorisch induzierten Zelltod involviert (Elliot-Hunt et al., 2002). In anderen zellulären Systemen, wie den AtT-20 Zellen, stimuliert CRH via den ERKs die Aktivierung von Nur Transkriptionsfaktoren und induziert Proopiomelanocortin. In Y79 Neuroblastoma Zellen vermitteln die ERKs die CRH-

induzierte Unterdrückung von Caspase-abhängiger Apoptose und Zytotoxizität (Kovalovsky et al., 2000; Radulovic et al., 2003).

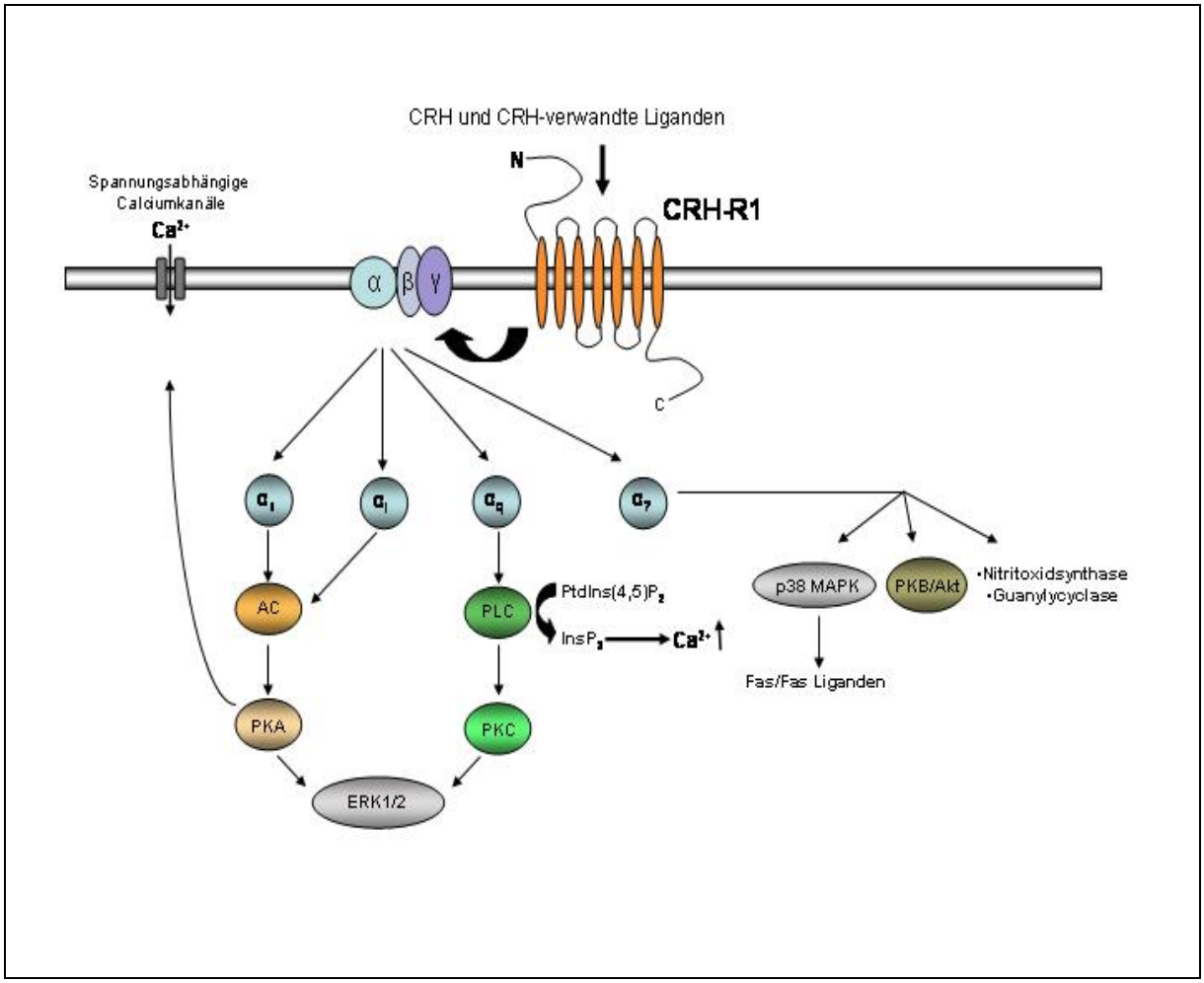


Abbildung 1-4: CRH-Rezeptor 1-abhängige intrazelluläre Signalkaskaden. CRH und verwandte Peptide binden an den Rezeptoren und können verschiedene G-Proteine stimulieren, was zur Aktivierung multipler Signalkaskaden führt. Die Aktivierung ist abhängig vom Liganden und vom Gewebe. In bestimmten Zelltypen können auch andere Signalmoleküle (z.B. NOS, Fas Ligand) reguliert werden.

1.2.5 Die Dysregulation der HPA-Achse und affektive Störungen

Grundsätzlich ist eine Stressreaktion, die in einer Aktivierung der HPA-Achse resultiert, von begrenzter Dauer. Diese zeitlich beschränkte Natur des Prozesses stellt sicher, dass die antireproduktiven, wachstumshemmenden, katabolischen und immunsuppressiven Effekte, die eine Stressreaktion begleiten, eher nützlich als schädlich sind. Im Gegensatz dazu führt eine chronische Aktivierung oder fehlende Kontrolle des Stresssystems zu einem krankhaften Zustand. Stressreiche Ereignisse erhöhen dabei häufig die Vulnerabilität für affektive Störungen und Angsterkrankungen, außerdem können sie den Beginn einer Depression

einleiten und den Verlauf dieser Krankheit beeinflussen (Dunner et al., 1979, Brown et al., 1987, Hammen et al., 1992).

Da CRH die verhaltensspezifischen, neuroendokrinen und autonomen Anpassungen während stressvoller Erfahrungen koordiniert, wurde in den letzten Jahren die Hypothese aufgestellt, dass CRH für die pathogenen Folgen von Stress mitverantwortlich ist (Chrousos, 1998).

Abnormale, exzessive Aktivierung der HPA-Achsen-Aktivität konnte in etwa der Hälfte an Depression erkrankter Individuen beobachtet werden (Sachar und Baron, 1979; De Kloet et al., 1988; Arborelius et al., 1999; Holsboer, 2001). Bei vielen Patienten, die an einer schweren Depression leiden, konnte eine Dysregulation der circadianen Cortisolsekretion mit deutlich erhöhten Blutwerten verglichen mit gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden (Wong et al., 2000; Gold und Chrousus, 2002). Es gibt außerdem direkte und indirekte Hinweise auf eine Hypersekretion von CRH bei depressiven Patienten (Arborelius et al., 1999; Holsboer, 2001; Kasckow et al., 2001), so wurden dort erhöhte Konzentrationen von CRH in der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) nachgewiesen. Eine geringe Anzahl von *postmortem* Studien zeigen, dass die CRH-Expression im PVN von Depressiven erhöht ist, die CRH-Rezeptor-Expression selbst aber im präfrontalen Cortex reduziert ist (Raadsheer et al., 1994). Übereinstimmend mit diesen humanen Studien sind die Ergebnisse, die man bei Versuchen mit Nagetieren beobachten konnte. Wurde CRH in das zentrale Nervensystem von Versuchstieren verabreicht oder in transgenen Tieren überexprimiert, so zeigten diese Tiere Verhaltensweisen, die den Krankheitssymptomen bei depressiven Patienten ähneln (Tabelle 1-1).

Zentrale Verabreichung von CRH bei Versuchstieren führt zu	**Verstärkte Aktivität von CRH bei Depressionen wird assoziiert mit**
Verstärktem Angst-ähnlichen Verhalten	Verstärkter Ängstlichkeit
Veränderten lokomotorischer Aktivität	Psychomotorischer Unruhe
Reduzierter Nahrungsaufnahme	Appetitverlust
Gewichtsverlust	Gewichtsverlust
Verändertem Schlafverhalten	Schlafstörungen und Insomnie
Abnahme der sexuellen Aktivität	Reduzierte Libido

Tabelle 1-1: Auswirkungen der Veränderung zentraler CRH-Konzentration
(nach Dunn und Berridge, 1990).

Es konnten gesteigerte Angst und Wachsamkeit, Appetit- und Gewichtsverlust, verändertes Schlafverhalten und eine Abnahme der sexuellen Aktivität bei diesen Tieren beobachtet werden (Dunn et al., 1990; Groenink et al., 2002; Stenzel-Poore et al., 1992).

Bis jetzt konnte der genaue Mechanismus, wie eine hyperaktive HPA-Achse bei der Entstehung oder am Verlauf einer psychischen Krankheit wie der Depression beteiligt ist, nicht aufgeklärt werden. Die Corticosteroide und deren Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der HPA-Achse, da sie eine negative Rückkopplung auf Hirnregionen wie Hypothalamus und Hippokampus ausüben. Eine Beeinträchtigung der Funktion dieser Rezeptoren würde die Überaktivierung der HPA-Achse erklären. Erhöhte Glucocorticoidwerte können außerdem hippokampale Neurone schädigen und Neurogenese im Hippokampus beeinträchtigen und damit zu kognitiven Defiziten beitragen (McEwen, 2000; Sapolsky, 2000; Fuchs und Gould, 2000). Eine andere Erklärung könnte eine verstärkte Freisetzung von CRH im Hypothalamus sein, die zu einer Disinhibition der HPA-Achse führt, was wiederum eine Erhöhung der Cortisolwerte zur Folge haben würde. Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass die erhöhte CRH-Ausschüttung ausschließlich im PVN stattfindet. Es wird angenommen, dass CRH auch vom zentralen Nukleus der Amygdala verstärkt freigesetzt wird, da dieser Kern unter der positiven Kontrolle von Glucocorticoidhormonen steht und depressive Patienten erhöhte Glucocorticoidwerte haben. Die erhöhte Expression in diesem Bereich der Amygdala könnte daher für die Zunahme von Emotionalität und Angst, beides Symptome, die häufig mit Depression assoziiert sind, verantwortlich sein (Davis 1990; Gray 1992). Desweiteren besitzt der zentrale Nukleus der Amygdala stimulatorischen Einfluss auf die HPA-Achse, direkt über den paraventrikulären Nukleus (PVN) und indirekt über den BNST (Reul et al., 2000). Es konnte bisher jedoch nicht geklärt werden, ob diese Abnormalitäten der HPA-Achse die primäre Ursache der Depression oder eher sekundär sind (Weiss et al., 1986; Buwalda et al., 1997; Kagamiishi et al., 2003).

Es wird außerdem angenommen, dass das CRH-System bei der Entwicklung von Angsterkrankungen involviert ist. CRH kann in der Maus durch die Aktivierung des CRH-R1 Angst-ähnliche Verhaltensweisen hervorrufen (Dautzenberg und Hauger, 2002). Mäuse, bei denen der CRH-R1 deletiert wurde, zeigen ein reduziertes Angstverhalten (Smith et al., 1998; Timpl et al., 1998). Inhibiert man die CRH-R1 Expression durch zentrale Verabreichung von CRH-R1 *antisense* Oligodeoxynukleotiden, so hat dies einen anxiolytischen Effekt (Heinrichs et al., 1997; Liebsch et al., 1995, 1999; Skutella et al., 1998). Auch nach Behandlung mit spezifischen CRH-R1 Antagonisten kann man ein reduziertes Angstverhalten beobachten (Deak et al., 1999; Lundkvist et al., 1996; Okuyama et al., 1999; Schulz et al., 1996).

Umgekehrt zeigen transgene Mäuse, in denen CRH überexprimiert wurde, und Tiere, denen CRH zentral verabreicht wurde, ein verstärktes Angstverhalten (Stenzel-Poore et al., 1994; Dunn und Berridge, 1990).

Die Rolle des CRH-R2 bei der Entstehung von Angstverhalten ist weniger eindeutig als die des CRH-R1. Bei zwei Mauslinien, bei denen dieser Rezeptortyp deletiert wurde, konnte eine Zunahme im Angstverhalten beobachtet werden (Bale et al., 2000; Kishimoto et al., 2000). Eine andere Forschungsgruppe konnte hingegen keine Unterschiede im Verhalten der CRH-R2 Knockout-Mäuse verglichen mit Kontrolltieren zeigen (Coste et al., 2000). Anhand von pharmakologischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des CRH-R2 sowohl anxiolytische als auch anxiogene Effekte haben kann, je nachdem wann das Tier getestet wurde und wo der aktivierte Rezeptor lokalisiert ist. Im lateralen Septum verstärkt die CRH-R2-Aktivierung nach 30 min Angst-ähnliches Verhalten, im Gegensatz dazu führt *icv* Verabreichung des CRH-R2 Agonisten UCNII zu einem reduzierten Angst-ähnlichen Verhalten nach 4 Stunden (Radulovic et al., 1999; Valdez et al., 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass CRH-R2 in Stressreaktionen involviert ist und die Fähigkeit besitzt, Angstverhalten zeitverzögert zu reduzieren.

Die Ergebnisse dieser Studien belegen, dass das CRH-System wichtige neuroendokrine, autonome und verhaltensspezifische Funktionen bei einer Stressreaktion koordiniert, und dass eine Dysregulation zur Pathogenese psychiatrischer Störungen beitragen kann. Die Untersuchung der Mechanismen, die der Stressreaktion unterliegen, können daher extrem hilfreich sein, um die Ätiologie Stress-abhängiger Störungen zu verstehen und die Entwicklung verbesserter Behandlungen unterstützen.

1.3 Genetische Manipulation des CRH-R1 bei Mäusen

Psychiatrische Erkrankungen wie die Depression werden als multifaktorielle Störungen betrachtet, bei denen multiple Gene involviert sind (Sullivan et al., 2000). Daher ist es problematisch, einzelne kausale Gene zu identifizieren, um diese dann an einem Tiermodell zu untersuchen. Eine weitere Problematik ergibt sich aus den Symptomen einer Depression, die die Krankheit beim Menschen begleiten, wie zum Beispiel das Gefühl von Wertlosigkeit, Schuldgefühle oder Selbstmordabsichten, die nicht am Tiermodell imitiert werden können. Dennoch gib es Verhaltenssymptome bei einer Depression, die man durch geeignete Verhaltenstests auch bei der Maus untersuchen kann, wie Angstverhalten, Veränderungen im aktiven Verhalten, Schlaf und Essverhalten oder kognitive Störungen. Da eine Dysregulation

des CRH-Systems mit solchen Störungen in Verbindung gebracht werden kann, hat sich die gentechnische Veränderung von Komponenten dieses Systems bei der Maus als geeignet erwiesen, um die komplexen Interaktionen besser zu verstehen und weitere Kandidatengene zu identifizieren.

Zwei voneinander unabhängige Gruppen haben 1998 zwei Mauslinien generiert, bei denen der CRH-R1 deletiert wurde, um die physiologische und verhaltenspezifische Rolle dieses Rezeptors zu untersuchen (Timpl et al., 1998; Smith et al., 1998). Beide Mauslinien zeigen eine abgeschwächte Reaktion der HPA-Achse auf Stress und eine chronische Glucocorticoiddefizienz. Durch Verhaltenstest konnte gezeigt werden, dass diese Mausmutanten außerdem ein verstärktes exploratorisches Verhalten besitzen und ihr Angstverhalten unter basalen Bedingungen deutlich reduziert ist. Nach wiederholtem Stress zeigen diese Tiere einen anhaltend erhöhten Alkoholkonsums, was darauf hinweist, dass das CRH-R1 Gen ein genetischer Risikofaktor für Stress-induzierten Alkoholismus darstellen könnte (Sillaber et al., 2002).

Das konventionelle Ausschalten des CRH-R1-Gens beeinflusst sowohl die Regulation des neuroendokrinen Systems als auch das Angstverhalten der Mausmutanten. Die Verhaltensanalyse wird daher durch die Tatsache beeinträchtigt, dass diese Mausmutanten unter einer deutlichen Glucocorticoiddefizienz leiden. Es ist bekannt, dass Glucocorticoide sowohl emotionale als auch kognitive Prozesse modulieren können. Das konnte bei Mausmutanten nachgewiesen werden, bei denen der Glucocorticoidrezeptor im Nervensystem deletiert wurde. Diese Mutanten zeigen eine Beeinträchtigung in ihren Stressreaktionen und ein reduziertes Angstverhalten (Tronche et al., 1999). Man kann also nicht mit Sicherheit feststellen, ob der anxiolytische Effekt, der bei CRH-R1 Knockout-Mäusen beobachtet wurde, nur durch die CRH-R1-Defizienz oder auch durch den reduzierten Glucocorticoidspiegel beeinflusst wurde. Um dieser Frage nachzugehen und die CRH-R1-abhängigen Signalwege im zentralen Nervensystem von den Signalwegen, die die neuroendokrine Funktion des Rezeptors vermitteln, zu unterscheiden, wurde eine Mauslinie generiert, in der das Gen konditional ausgeschaltet wurde (Müller et al., 2003). Bei diesen Mausmutanten wurde das CRH-R1-Gen wurde unter Verwendung des Cre/loxP Systems spezifisch deletiert. Als treibender Promotor für die Cre-Rekombinase-Expression wurde der Promotor der Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen-Untereinheit IIα (CaMKIIα) gewählt. Das CaMKIIα-Gen wird spezifisch im anterioren Vorderhirn der Maus und dort besonders stark in limbischen Strukturen, wie dem Hippokampus und der Amygdala, sowie in kortikalen Zellschichten exprimiert und der CRH-R1 somit räumlich kontrolliert deletiert. Im

Hypothalamus und der Hypophyse hingegen wird die Expression des Rezeptors nicht beeinträchtigt und somit die Regulation der HPA-Achse über diese Regionen nicht gestört. Im Gegensatz zu den konventionellen CRH-R1 Mausmutanten zeigte diese Mauslinie keine Veränderungen in den basalen Glucocorticoid- und ACTH-Werten. Der Angst-reduzierte Phänotyp der konditionalen Mutanten konnte durch Verhaltenstests bestätigt werden. Das wiederum zeigt, dass die limbische Expression des CRH-R1 das Angstverhalten moduliert und der Verhaltensphänotyp, der bei den konventionellen CRH-R1 Mutanten beobachtet wurde, nicht durch die Glucocorticoiddefizienz beeinflusst wurde. Außerdem zeigen die Mausmutanten eine normale Stressreaktion nach verschiedenen Zeiträumen von Immobilisationsstress. ACTH- und Glucocorticoidplasmawerte waren allerdings nach 30 und 90 Minuten nach kurzem Immobilisierungsstress signifikant erhöht, was darauf hinweist, dass der CRH-R1 im limbischen System für die zentrale Kontrolle der HPA-Achsen-Rückkopplung mitverantwortlich ist.
Die Ergebnisse dieser Studien mit gentechnisch veränderten Komponenten des HPA-Systems zeigen, dass sich diese Mausmutanten eignen, die Stressreaktion zu erforschen und dazu beitragen, neue Strategien zur Therapie von stressbedingten Störungen zu entwickeln.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Die Familie der CRH-verwandten Peptide und deren Rezeptoren sind grundlegende neuroendokrine Komponenten der Stressachse im Organismus. Sie regulieren jedoch nicht nur die Aktivität der HPA-Achse sondern auch eine Vielzahl von Verhaltensweisen und physiologischen Funktionen, die den Körper an eine Stressreaktion anpassen. Klinische Forschungsergebnisse, pharmakologische Studien und Arbeiten mit gentechnisch veränderten Mäuse zeigen deutlich, dass das CRH-System die Pathogenese psychiatrischer Krankheiten wie Depressionen und Angststörungen beeinflussen kann. Die genetische Manipulation des CRH-Systems durch konventionelle und konditionale Mutagenese des CRH-R1 Rezeptors in der Maus ermöglichen es, molekulare Mechanismen genauer zu untersuchen, welche die Aktivität der HPA-Achse beeinflussen und die neuronalen Schaltkreise verhaltensspezifischer Stressreaktionen regulieren. Untersuchungen an den konventionelle und konditionalen CRH-R1 Mausmutanten ergaben, dass die Funktion des CRH-R1 im limbischen System für das reduzierte Angstverhalten dieser Mäuse verantwortlich ist und außerdem die zentrale negative Rückkopplungskontrolle der HPA-Achse reguliert.

Obwohl bereits viele Studien die intrazellulären Signalwege, die nach CRH-Stimulation aktiviert werden, untersucht haben, ist unser Wissen über molekulare Mechanismen, die durch diese Signalkaskaden initiiert werden, doch eher limitiert.

Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, Gene zu identifizieren, die mit CRH-abhängigen Signaltransduktionskaskaden in Zusammenhang stehen. Dafür haben wir zwei unterschiedliche experimentelle Verfahren angewendet. Mit der *Microarray*-Technologie sollte die Expression von Genen, die in Signalkaskaden involviert sind, die direkt oder indirekt beeinflust werden, analysiert werden. Im Gegensatz dazu sollten mit dem *Yeast two-hybrid*-Verfahren direkte Interaktionspartner auf Proteinebene identifiziert werden.

Gegenstand der *Microarray*-Analyse waren spezifische Hirnregionen der konventionellen und konditionalen CRH-R1 Mausmutanten sowie die Hypophyse der konventionellen CRH-R1 Knockout-Mäuse. Die Identifizierung differentiell exprimierter Gene soll Hinweise auf die molekularen Mechanismen liefern, die den neuroendokrinologischen und verhaltensspezifischen Veränderungen zugrunde liegen, die durch die Deletion des CRH-R1 bedingt wurden.

Die *Microarray*-Methode ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung der Expression mehrerer tausend Gene in einem Experiment (Schena et al., 1999). Zahlreiche Studien belegen die erfolgreiche Anwendung der *Microarray*-Technik bei der Identifizierung von Genen, die in die Pathophysiologie psychischer Störungen involviert sind (Luo et al., 2001; Mirnics und Pevsner, 2004). Die Analyse der Genexpressionsprofile von humanen *postmortem* Hirngeweben hat es ermöglicht, einen Einblick in die molekulare Mechanismen zu gewinnen, die psychischen Krankheiten zugrunde liegen könnten. Aston und Mitarbeiter konnten bei Patienten mit depressiven Störungen Veränderungen der Expression von Genen beobachten, die in die Neuronalentwicklung, Signaltransduktion und Zellkommunikation involviert sind (Aston et al., 2005). Eine andere Gruppe konnte eine Veränderung des *Fibroblast growth factor*-System in Zusammenhang mit Depressionen mit Hilfe von *Microarrays* identifizieren (Evans et al., 2004). Außerdem wurde die *Microarray*-Technologie angewendet, um die molekularen Ursachen von Schizophrenie, bipolaren Störungen, der Alzheimer Krankheit und Alkoholmissbrauch zu untersuchen (Mirnics et al., 2000; Woo et al., 1998; Volk et al., 2000; Tkachev et al., 2003; Bezchlibnyk et al., 2001; Sokolov et al., 2003; Iwamoto et al., 2004; Ogden et al., 2004).

Mit dem *Yeast Two Hybrid*-Verfahren sollten neue Interaktionspartner der cytoplasmatischen Domäne des CRH-R2 identifiziert werden, was zur Aufklärung von Signaltransduktionsmechanismen beitragen soll, die durch die Aktivierung des Rezeptors

induziert werden. Die *Yeast two-hybrid*-Suche mit der carboxyterminalen Domäne des CRH-R1 wurde in unserer Gruppe bereits erfolgreich durchgeführt. Die auf diese Weise erfolgte Identifizierung von PSD-95 als molekularen Interaktionspartner des Rezeptors konnte weitere Hinweise liefern, die zur Aufklärung CRH-abhängiger Signalmechanismen beitragen (Breu et al., 2005, zur Publikation eingereicht).

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Lösungen

Substanz	**Bezugsquelle (Katalognummer)**
-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech, Palo Alto, CA, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (M6250)
Acrylamid	Bio-Rad
Agarose	Invitrogen (15510-027)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (A9518)
Ampuwa®-H_2O	Fresenius (1654198)
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Co. (214010)
BES	Sigma-Aldrich (B4554)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (B7021)
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich (A7906)
Chloroform	Merck (1.02445)
Chloramphenicol	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad (161-040)
Deoxynucleoside Triphosphate Set	Roche Diagnostics (1969064)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck (1.06586)
DTT (Dithiothreitol)	Merck (1.120.130.001)
DPX Einbettmedium	BDH, England
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich (E5134)
Essigsäure	Merck (8.18755)
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich (A6404)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (E1510)
Ficoll	Amersham Pharmacia (17.0400)
Formamid	Roth (6749.1)
Glutaraldehyd (25%)	Sigma-Aldrich (G5882)
Glycerol	Sigma-Aldrich (G7893)
Glycin	Sigma-Aldrich (G8790)
Glutathione, reduziert	Sigma-Aldrich (G4251)
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Roth (2316.2)
Igepal (NP-40)	Sigma-Aldrich (I3021)
Isopropanol	Roth (6752.2)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (1.04873)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (K0879)

Kresylviolett	Merck (5235)
Lauryl Sulfat (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (L4509)
Minimal SD Base	Clontech (8602-1)
-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech (8608-1)
-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech (8619-1)
L-Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich (A9126)
L-Histidin	Sigma-Aldrich (H9511)
L-Leucin	Sigma-Aldrich (L1512)
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich (T0254)
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich (L4158)
Minimal SD Base	Clontech (8602-1)
MOPS (3-Morpholinpropansulfonsäure)	Sigma-Aldrich (M9381)
N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich (L5125)
Polyethylen Glycol	Sigma-Aldrich (P2139)
Reduziertes Glutathione	Sigma-Aldrich (G4251)
Szintillationslösung	Roth, Karlsruhe (0016.2)
Trichlormethan/Chloroform	Roth 3313.2
Triethanolamin	Sigma-Aldrich (T1377)
Tris (Trishydroxymethyl-aminoethan)	Roth
TRIZOL	Invitrogen (15596)
Tween-20	Bio-Rad (1706531)
X-α-Gal	Clontech (8061-1)
YPD-Medium	Clontech (8601)

2.2 Enzyme

Enzym	**Bezugsquelle (Katalognummer)**
DNase I, RNase -frei	Roche Diagnostics (84105421-23)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (P6556)
Restriktionsenzyme mit 10x Puffer	NEB, Fermentas
RNase A	Roche Diagnostics (109142)
RNase H	Invitrogen (18021-014)
RNasin	Roche Diagnostics (3335399)
Superscript™ II Plus Reverse Transkriptase	Invitrogen (18064)
T3- RNA-Polymerase	Roche Diagnostics (1031663)
T7-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics (881767)
T4 DNA-Polymerase	Roche Diagnostics (481220)
Taq DNA-Polymerase	Roche Diagnostics (1647679)

2.3 Nukleotide und Nukleinsäuren

Nukleotide/Nukleinsäuren	Bezugsquelle (Katalognummer)
α-^{32}P-dCTP	Amersham
α-^{32}S-UTP	Amersham
Desoxynukleotide	Roche Diagnostics (1277049)
DNA-Längenstandards: Smart Ladder 1 Kb Plus DNA Ladder	 Eurogentec, Belgien (MW-1700-02) Invitrogen (10787-018)
Heringssperma-DNA	Roche Diagnostics (85346024-39)
Mouse COT-1 DNA	Invitrogen (18440-016)
RNA Ladder	Invitrogen (15623-010)
Ribonukleotide	Roche Diagnostics (85730020-50)
tRNA	Roche Diagnostics (84694421-87)

2.4 Kits und gebrauchsfertige Materialien

Kit	Bezugsquelle (Katalognummer)
Amino Acid Mixture Minus Methionine and Cysteine	Promega (L551A)
Amino Allyl MessageAmp™ aRNA Kit	Amersham (1752)
FluoroLink™ Cy5 mono-functional Dye 5-Pack	Amersham Bioscience (PA 25001)
FluoroLink™ Cy3 mono-functional Dye 5-Pack	Amersham Bioscience (PA 23001)
Glutathione Sepharose 4B	Pharmacia, Biotech
LightCycler FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green	Roche Applied Science (035158689001)
Megaprime DNA Labeling System	Amersham Bioscience (RPN1604)
PRO-MIX TM L-35S in vitro Cell labelling mix	Amersham Bioscience (SJQ0079)
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen (28706)
QIAquick Spin Miniprep Kit	Qiagen (27106)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (74104)
TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega (L4610)
TOPO TA Cloning Kit pCRII Topo	Invitrogen (450640)
Wizard Midiprep DNA Purification System	Promega (A7640)

2.5 Puffer und Medien

Puffer	**Zusammensetzung**
6-fach konzentrierter Agarosegelladepuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylene Cyanol 15% Ficoll
Ampicillinstammlösung	50 mg/ml Ampicillin in 75 % Ethanol
0,7% - 1,5% Agarosegele	0,7% - 1,5% Agarose 0,1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer
Chloramphenicolstammlösung	34 mg/ml in 70 % Ethanol
Denaturierungspuffer	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
DEPC-H_2O	2 ml DEPC ad 2 l ddH_2O, kräftig schütteln, 4 h RT, 2x autoklaviert
dNTP-Lösung	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA (pH 8,0)
Eluierungspuffer (GST-Proteine)	10 mM reduziertes Glutathion 50 mM Tris-HCl pH 8,0
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
GST-*pull-down* Puffer	50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1mM EDTA pH 8,0 0,5 % NP-40 1 mM DTT
Hybridisierungsmix (*in situ*)	50 % deionisiertes Formamid 20 mM Tris-HCl pH 8.0 300 mM NaCl 5 mM EDTA pH 8.0 10 % Dextransulfat 0.02 % Ficoll 400 0,02 % PVP40 0.02 % BSA 0,5 mg/ml tRNA 0,2 mg/ml Heringssperma DNA 200 mM DTT
Hybridisierungslösung (*Microarray*)	50 % Formamid 5x SSC 0,1 % SDS 0,1 mg/ml Mouse Cot
IPTG-Lösung	100 mg/ml in ddH_2O, sterilfiltriert

Puffer	**Zusammensetzung**
Kanamycinstammlösung	10 mg/ml Kanamycin
Lithiumacetat-TE-Puffer	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA
Neutralisierungslösung	0.5 M Tris/HCl pH 7.5 5 mM EDTA pH 8.0
NTE, 5x	2.5 M NaCl 50 mM Tris-HCl pH 8.0 25 mM EDTA
Prähybridisierungslösung (*Microarray*)	50 % Formamid 5x SSC 0,1 % SDS 0,1 mg/ml BSA
PBS-Lösung	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 2 mM KH_2PO_4
RNA-Laufpuffer, 10x	200 mM MOPS 50 mM NaAc 10 mM EDTA pH 0.7
RNA-Ladepuffer	0,025 % Bromphenolblau in H_2O 40 % Formamid 20 % Formaldehyd 20 % 10x Laufpuffer
SDS-Polyacrylamid-Trenngel 10% oder 8%	10% bzw 8% Acrylamidmix 0,375 M Tris pH 8,8 0,1% SDS 0,1% Ammoniumpersulfat 0,04% TEMED
SDS-Polyacrylamid-Sammelgel	5 % Acrylamidmix 0,125 M Tris pH 6,8 0,1 % SDS 0,1 % Ammoniumpersulfat 0,04 % TEMED
SDS-Gelladepuffer, 2x	100 mM Tris pH 6,8 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 200 mM β-Mercaptoethanol
SSC, 20x	3 M NaCl 0,3 M Natruimcitrat, autoklaviert
STE	10 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA

Puffer	Zusammensetzung
Stripping Puffer (Western Blot)	5 mM PBS pH 7.2 2 mM β-mercaptoethanol 2 % SDS
TBE, 10x	1 mM Tris-Base 0,83 mM Borsäure 20 mM EDTA (pH 8,0), autoklaviert
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% SDS
Transferpuffer (Tank-Transfer)	25 mM Tris 192 mM Glycin 10% Methanol 0,5 g/l SDS
Transformationspuffer (Hefe)	240 µl (50 % w/v) PEG 36 µl LiAc (1mM) 50 µl Heringssperm-DNA (1 mg/ml) 45 µl H_20

2.6 Medien für die Kultur von Hefen

Medium	Bezugsquelle (Katalognummer)
Agarmedien	1,5 % Bacto Agar in dem jeweiligen Flüssigmedium
LB-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl
SD-Medium ohne Leucin	640 mg/l -Leu/-Trp Dropout (DO)-Supplement 20 mg/l L-Tryptophan
SD-Medium ohne Tryptophan	640 mg/l -Leu/-Trp DO-Supplement 20 mg/l L-Leucin
SD-Medium ohne Tryptophan und Leucin	640 mg/l -Leu/-Trp DO-Supplement
SD-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin	600 mg/l –Ade/-His/-Leu/-Trp DO-Supplement 20 mg/l Histidin
SD-Medium ohne Tryptophan, Leucin, Adenin und Histidin	600 mg/l –Ade/-His/-Leu/-Trp DO-Supplement
synthetische definierte (SD-) Medien	26.7 g/l Minimal SD-Base
YPDA-Medium	50 g/l YPD-Medium 0,003 % Adeninhemisulfat

2.7 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle (Katalognummer)
Elektroporationsküvetten	Peqlab (71-1020)
Glasperlen 425-600 Microns	Sigma-Aldrich (G8772)
Hybond-N^+	Amersham (RPN 203 B)
Lifter Slips mSeries	Erie Scientific (18883743724)
LightCycler Kapillaren 20 µl	Roche (11909339001)
Rapid-hyp buffer	Amersham Bioscience
Röntgenfilme Biomax MR	Kodak, New Haven , USA (V1435726)
Sterilfilter 0,45 µm	Sartorius (17598)
SuperFrost® Plus Objekträger	Fisher Scientific
Tissue Tek	Polysciences
Trockenperlen	Roth (0728.1)

2.8 Geräte

Gerät	Bezugsquelle (Katalognummer)
Autoklav Typ 24	Melag, Berlin
Biofuge pico	Heraeus Instruments
Concentrator 5301	Eppendorf
Elektrophoresezubehör	MWG Biotech
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Amersham Pharmacia
Entwicklermaschine (XP2000)	3M/Kodak
Geldokumentationssystem BioDoc	Biometra
Gelkammern	MWG Biotech
Gene Pulser II	BioRad
GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer
Heizblöcke Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
J2-MC-Zentrifuge	Beckmann
JLA 16.250-Rotor	Beckmann
Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf
Kryostat HM 560	Microm, Walldorf
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Mini Protean 3 PAGE-System	BioRad (165-330172)
pH-Meter pH 538	WTW, Weilheim
Phosphorimager	BAS 3000 Fujix
Photometer GeneQuant II	Amersham

Gerät	Bezugsquelle (Katalognummer)
Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 CN	Seral, Ransbach-Baumbach
Laserscanner Scan Array 4000	Perkin Elmer
LightCycler 1.5 und 2.0 Instrument	Roche Diagnostics
LightCycler Sample 2.0 Carousel	Roche Diagnostics
Schüttler Duomax 1030	Heidolph
Schüttler SM25	Edmund Bühler
Szintillazionsmesser	Beckmann Instruments, USA
Spectrophotometer DU 640	Beckmann
UV Stratalinker 4000	Stratagene
Vortex MS1 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Waagen 40SM-200A/LP 4200S	Precisa, Dietkon, Schweiz/Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	GFL, Burgwedel Julabo

2.9 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle (Katalognummer)
anti CRF-RI/II (C-20) (polyklonal, goat)	1:100	Santa Cruz Biotechnology (sc-1757)
anti GST (polyklonal, goat)	1:1000	Amersham Bioscience (27-4577-01)
Donkey anti-goat IgG HRP	1:5000	Santa Cruz Biotechnology (sc-2020)

2.10 Besondere Reagenzien und Materialien für Immundetektion

Reagenzien/Materialien	Bezugsquelle (Katalognummer)
Nitrozellulosmembran Optitran BA-S883	Schleicher&Schuell (10439394)
Milchpulver	Regilait, Saint-Marin-Belle-Roche, France
LumiGlo Reagent A	Cell Signaling (7003)
Peroxide Reagent B	Cell Signaling (7003)
Precision Plus Protein™ Standard	Bio-Rad (161-0373)
Whatman-3MM-Filterpapier	Whatman

2.11 Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Herkunft (Katalognummer)
Rosetta™ (D3) Singles™ Competent Cells	Novagen (71099-3)
E. coli DH5α	Invitrogen (18265-017)
S. cervisiae AH 106	Clontech (MY4008AH)
S. cervisiae Y187	Clontech (MY4008AH)
Pretransformed Matchmaker Library, Mouse Brain, pooled from 200 BALB/c males, ages 9-12 weeks, in *S. cervisiae* Y187	Clontech (MY4008AH)

2.12 Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pCR®II-TOPO	Invitrogen
pGADT7	Clontech (K1612-1)
pGBKT7	Clontech (K1612-1)
pGBKT7-Lam	Clontech (K1612-1)
pGBKT7_cy2	Engeholm, 2001
pGEX-4T-2	Amersham (27-4581-01)

2.13 Oligonukleotide

Die hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) hergestellt. Die Oligonukleotide, die für die quantitative *real-time* PCR verwendet wurden, sind HPLC-aufgereinigt. Die Sequenz ist jeweils 5´-3´angegeben.

2.13.1 Quantitative *real-time* PCR

Oligonukleotid	sense (_for)	antisense (_rev)
2810457I06Rik	ggagtttccaggtgacgaaa	tgacaggtacacgcttcgag
1810008A14Rik	ggcctgcaaacgttaaaaga	caagggcacgcagaaagt
2610042L04Rik	ccataattggttccatgcag	accagcaggcttctgttctc
170000E04Rik	tgtggaatcctgaacctttaca	ttcctcggagaacttcatgg

Oligonukleotid	**sense (_for)**	**antisense (_rev)**
170000E04Rik_2	acagaaagctgctggtggag	gggggatttcatgatcacac
9630019K15Rik	ttccccaggtgtgcttattc	tcaggcgagtctgttgtgtc
D030041I09Rik	acccatgggagtgctatcag	caggtgtcatggaaggtgtg
d19ertd386e	agcaaaggaacgacctgaga	gcagtttcctgagctctgct
A2m	gcagctgacacaggagatca	catcccggtgcttgtagttt
Aldoc3	gcctattgtggagcctgaga	accatattgggcttgagcag
Atp1b3	atcgtgtttgccaaaggaag	gacctgtacggcaactaggg
Clstn3	ccgatactccagcaacgaat	tgcaggaactgctgtgaact
Clqtnf5	gatcagccttcagtgccaag	gccagtagtggggtcgtaat
Cpeb3	taagtcggcagactgacacg	gcagtgaccgtctcacagaa
Daf1	tcgaaaacaaccctctccac	atgccggttggtatgttgat
Eef1a1	tagacgaggcaatgttgctg	agcgtagccagcactgattt
Fyco1	ctcctgggaagcaagaaaga	agacaggtggcccttacctt
G3b2	agccccaggaagcagtttat	tcactcaaggttgcatgagc
G3b2_2	ccggacagtcatcagctttt	cgaagttccacaacgtttcc
Gbas	taccaactccgaccaggaac	agctgcccaatttgagagaa
Gng2	gaagccaacatcgacaggat	gttttctgaggctgggactg
Hspca	gggacgagatggtttctctg	gttccacaaaggcggagtta
Hprt	acctctcgaagtgttggatacagg	cttgcgctcatcttaggctttg
Ica1	ttccttccgtcacagctttt	gtcagcaaagaggctgaacc
Mtab1b	catccaaatcagcgaagacc	tgttgctgtggttgggaata
Nmu	ctctcctgtcactgctgctg	aaaggacgcacaagcttcat
Nptx1	aaaacccgactggagaacct	cagagtgttcacccgagaca
Oxr1	cctgaatctttccgaccaaa	ccatggatagccaatggttc
Pak3	tacttggctggtggctcttt	caaagcttggaggcactctc
Pld1_2	atatcaggctggtcgctttg	gctgctgttgaaacccaaat
Pld1	tgacccaagtgaggaccttc	ccgcagctggattaaattgt
Polybromo	atgacgaagatgggcaagac	gttcactgatgagccgtcct
Polybromo2	caatgagcctgggtctcaag	gccatggtaattgctgacaa
Prkaca	acctgaagcccgagaatctt	aaggtccaagtacggccttt
Prkcbp1	tcgctgagatgaagcacaac	tctccagctccagttgcttt
Plp	acctggaccacctgtcagtc	gaaagcattccatgggagaa
Ptgds	agtggtggaggccaactatg	tctccttcagctcgtccttc
Rab6	gaggaagaccaaagagctga	gtgtgctttccattccaggt
Rab6_spot6292	gcctttcttgcctcttccttt	gctcatagcctggagctgtc

Oligonukleotid	sense (_for)	antisense (_rev)
Rap2ip	tgatggagaagcgtatgtcg	atcagcatcccagtgaggac
Rgs4	tgcaagcaacaaaagaggtg	ctgggcttcatcaaaacagg
Sdcbp	gcaagggatccgtgaagtta	gtccccaaatctcagtccaa
Slc17a6	atgggatatggagcaagtgc	gcaatgactgctccagcata
Sorl1	tcgcttacagagcagcttca	atgggagcatcttcatcgtc
Taok	ggcactcaccctgagttgtt	ccttgcatacaagaggcaca
Ttc3	acctttccagtgtgcagctt	gctgtctacacaagccacca
Tm4sf11	gctgccacggttctctacat	cgtaggcaatcatcaccaga
Tm4sf17	gagggctccatctacaccaa	tgtcactcacgaggttctgg
Ttr	gcttcccttcgactcttcct	gcatccaggactttgaccat
Tuba1	ccagatgccaagtgacaaga	gtgggttccaggtctacgaa

2.13.2 GST-*pull-down*

Oligonukleotid	
ythc4.1_insert_forward2	tacgaattcaacctgatccac
ythc4.1_insert_reverse	tatctcgagttaaaaattcaaagt
ythc11.1_insert_forward2	tctgaattccggcttcctctg
ythc11.1_insert_reverse2	tatctcgagtcactgccagaag
ythc44.1_insert_forward2	actgaattccctctgcgttcc
ythc44.1_insert_reverse2	actgaattccctctgcgttcc
ythc55.1_insert_forward2	aatgaattcaggatgtccgc
ythc55.1_insert_reverseB	ataggatccttacattccaga
mCRH_R2cy2GSTfus5´	gccgcgaattccctgcttcttcaatggagaggtg
mCRH_R2cy2GSTfus3´	gccgcctcgaggtgacagagggtcacacagc

2.13.3 Sonstige Primer

Oligonukleotid	Sequenz bzw. Bezugsquelle (Katalognummer)
Gal4p_AD_sequencing	taccactacaatggatg
oligo(dT)$_{12-18}$	Amersham (27-7858)

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Bakterien

Für die Kultur von Bakterien wurde Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet. Dieses wurde nach seiner Herstellung autoklaviert, und nach dem Abkühlen wurde der Flüssigkeit gegebenenfalls ein Antibiotikum zugegeben. Für die Herstellung von LB-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar zugegeben.

3.1.2 Herstellung chemo-kompetenter *E .coli* Bakterien

Mit einer Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes DH5α wurden 20 ml LB-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. 500 ml LB-Medium wurden dann mit 1 ml dieser Vorkultur inokuliert und bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (OD_{600nm}: 0,7-0,8). Die weiteren Schritte wurden im 4°C-Raum durchgeführt. Die Kultur wurde 45 min auf Eis abgekühlt und anschließend in zwei 250 ml vorgekühlte, sterile Polypropylen-Gefäße überführt. Die Bakterien wurden 8 min mit 3000 rpm im GSA-Rotor (Sorvall) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit je 50 ml eiskaltem TFB1-Medium resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann erneut abzentrifugiert, in je 10 ml TFB2-Medium aufgenommen und zu 100 µl in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70°C gelagert.
Die Kompetenz der *E. coli*-Zellen wurde durch Transformation von 1 ng pBluescript-DNS ermittelt. Die Effizienz beträgt in der Regel 1-4 x 10^6 Kolonien pro µg Plasmid-DNS.

3.1.3 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli* Bakterien

Mit einer einzelnen Bakterienkolonie des DH5α-Stammes wurde 50 ml LB-Medium angeimpft. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C auf einem Schüttelinkubator kultiviert. 500 ml LB-Medium wurden dann mit dieser Übernachtkultur inokuliert und bei 37°C auf einem Schütter inkubiert bis eine optische Dichte von OD_{600nm} 0,35-0,4 erreicht wurde. Die Kultur wurde in vorgekühlte Polypropylen-Gefäße überführt und für 15 min mit 2600 x g bei

4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde einmal mit ddH_2O, dann zweimal mit 10% Glycerol (jeweils 500 ml, eiskalt) gewaschen, in einem Volumen von 500 µl GYT-Medium resuspendiert und zu jeweils 40 µl auf vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einem vorgekühlten JLA16.250-Rotor in einer Beckman-J2-MC-Zentrifuge ausgeführt. Die Bakterienpellets wurden durch sehr vorsichtiges Überspülen mit der jeweiligen Resuspensionslösung aufgelöst. Die Kompetenz der Zellen sollte bei 1-2 x 10^6 Kolonien pro µg DNA betragen, was durch Elektroporation mit pBluescript-DNA überprüft wurde.

3.1.4 Transformation von Bakterien

3.1.4.1 Hitzeschocktransformation

Die kompetenten Bakterien wurden mit Plasmid-DNA (1-100 ng) oder Ligationsansätzen gemischt und 10 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 1 min und Inkubation für 5 min auf Eis, wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Kultur für 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 50-200 µl des Ansatzes auf eine Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.4.2 Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 20-200 ng/µl Plasmid-DNA versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Bakterien für eine Minute auf Eis gelagert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser (Biorad, München) bei 25 µF, 250 kΩ und 2,5 kV. Danach wurde 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben und die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden für 30 min bei 37°C geschüttelt und anschließend in 50–200 µl Aliquots auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2. Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

3.2.1.1 Minipräparation mit dem "QIAgen Spin Miniprep Kit" (alkalische Lyse)

Eine einzelne Bakterienkultur wird in 2 ml LB-Medium über Nacht kultiviert und anschließend 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das detaillierte Protokoll für die Plasmidpräparation kann dem Handbuch (QIAprep Miniprep Handbook 05/2004, S. 23) entnommen werden.

3.2.1.2 Midipräparation mit dem "Wizard Plus Midipreps DNA purification system" (Promega)

Um Plasmid-DNA in größerem Maßstab zu isolieren, wurde eine Bakterienkolonie über Nacht in 50-100 ml LB-Medium kultiviert. Das detaillierte Protokoll für die Plasmidpräparation kann dem Handbuch (TB173, Promega) entnommen werden.

3.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit"

Diese Methode der DNA-Isolierung aus Agarose basiert auf dem unterschiedlichen Adsorptionsverhalten von DNA gegenüber Silikatperlen abhängig von der Salzkonzentration und dem pH-Wert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA in einem präparativen Agarosegel wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des QUIAquick Gel Extraktions Kit eluiert. Das Protokoll kann dem Handbuch (QIAquick Spin Handbook 07/2002, S. 18) entnommen werden.

3.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von RNA und DNA erfolgte photometrisch. Es wurden geeignete Verdünnungen der Nukleinsäuren angesetzt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Die Gesamt-DNA bzw. RNA-Konzentration wurde wie folgt über E_{260} quantifiziert:

1 OD_{260} = 50 µg DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml

Konzentration der DNA [µg/ml] = OD_{260} * 50 * Verdünnungsfaktor

Konzentration der RNA [µg/ml] = OD_{260} * 40 * Verdünnungsfaktor

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Anschließend wurde Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugefügt. Die flüssige Agaroselösung wurde in eine Gelkammer gegossen, welcher in eine Gelelektrophorese-Apparatur eingesetzt wurde. Die DNA-Proben wurden mit dem DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 40-100 V für 1-3 h je nach Fragmentgröße in 1x TAE Laufpuffer. Die DNA wurde dann mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Die Plasmid-DNA wurde für eine Stunde mit 15 bis 20 Einheiten des Enzyms bei 37°C in einem entsprechenden Puffer verdaut. Die Konditionen für den Verdau werden vom Hersteller für die jeweiligen Enzyme empfohlen. Der Restriktionsverdau kann durch eine analytische Gelelektrophorese kontrolliert werden.

3.2.6 Ligation von DNA

3.2.6.1 Ligation mit der T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation in einen linearisierten Plasmid-Vektor wurde das zu ligierende DNA-Fragment dem geschnittenen Vektor in 2-10-fachem Überschuss angeboten. Die Möglichkeit einer Religation des Vektors wurde durch Erhöhung der Insert-Konzentration oder durch Dephosphorylierung des Vektors vermindert. Die Reaktion fand in einem Volumen von 10 µl statt. Dem Ligationsansatz wurden 1 x LB-Puffer, 1 µl ATP und 1 U T4-DNA-Ligase hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C, um die Aktivität des Enzyms zu verlängern.

3.2.6.2 Ligation mit dem TOPO-TA-Klonierungskit

PCR-amplifizierte DNA-Fragmente wurden über den von der *Taq*-Polymerase erzeugten 3´-A-Überhang in den pCRII-Vektor (Invitrogen, San Jose, USA) ligiert und nach der Vorschrift des Herstellers in TOP10F oder TOP10F´-Zellen des TOPO-TA Cloning Kits (Invitrogen) transformiert. Erfolgreich ligierte Transformanten wurden mit Hilfe des Blau/Weiß-*Screening*

identifiziert. Die "*Multiple Cloning site*" (MCS) des pCR2.1-Vektor befindet sich im lacZ-Gen, welches nach erfolgreicher Insertion keine funktionelle ß-Galactosidase expremieren kann. So erscheinen die Bakterienkolonien weiß und können für die weitere Analyse verwendet werden.

3.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels PCR können DNA-Fragmente gezielt amplifiziert werden. Hierfür werden zwei Oligonukleotide benötigt, die die gewünschte Sequenz flankieren und spezifisch an die DNA binden.
Die PCR-Reaktion wurde wie folgt in einem Volumen von 50-100 µl angesetzt:

1x	10x Reaktionspuffer
10 µmol	dNTPs
10 pmol	Primer sense
10 pmol	Primer antisense
1-2,5 U	Polymerase
10-50 ng	DNA

$MgCl_2$ ist im Reaktionspuffer meistens enthalten, ansonsten wurde dem Ansatz $MgCl_2$ in einer Endkonzentration von 0,5-5 mM zugegeben. Die PCR-Reaktion wurde dann in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	1 Zyklus	95°C	2 min
Denaturierung	25-35 Zyklen	95°C	30 sec
Annealing		50-65°C	30 sec
Elongation		72°C	30-90 sec
	1 Zyklus	72°C	10 min

Die *Annealing*-Temperatur liegt ca. 5°C unter der berechneten Schmelztemperatur (T_m) der Primer. Die Dauer der *Elongation* ergibt sich aus der Größe des jeweiligen Amplifikationsprodukt (30 sec je 500 Bp). Für die PCR können je nach Problemstellung

verschiedene DNA-Polymerasen verwendet werden. Die pfu-Polymerase besitzt zusätzlich eine 3´→5´- Exonukleaseaktivität und steigert damit die Präzision der DNA-Synthese, was sich bei der Amplifizierung von längeren DNA-Abschnitten anbietet.

3.2.8 DNA-Sequenzierung und Computer-gestützte Sequenzanalysen

Bei den Sequenzierungen wurde die "*dye deoxy terminator cycle sequencing*"- Methode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Didesoxynukleotid-Terminatoren angewandt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma "Sequiserve", Vaterstetten, durchgeführt.

3.3. Genotypisierung mittels *Southern Blot*

3.3.1 Isolation von genomischer DNA

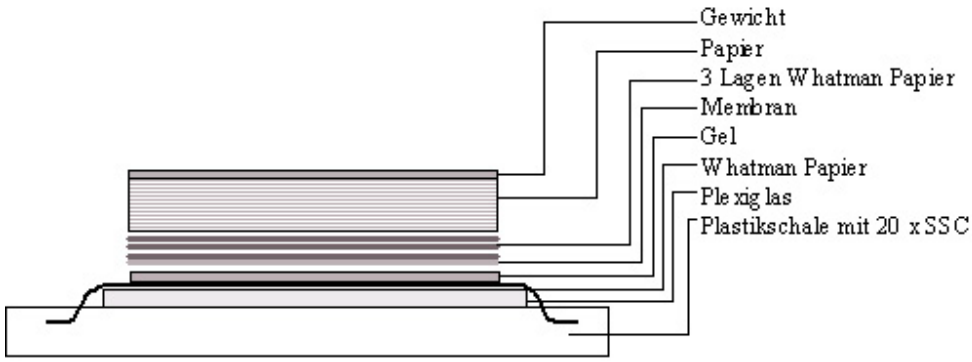
Um die gentechnisch veränderten Mauslinien zu genotypisieren, wurde genomische DNA aus deren Schwanzgewebe gewonnen. Die Isolation erfolgte mit dem "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" von Promega und dem dazugehörigen Protokoll (Bedienungsanleitung Version 050, Protokoll D. 3). Im Anschluss an die Isolation wurde die rehydrierte DNA bei 4°C aufbewahrt und konnte dann für die Analyse mittels PCR oder *Southern* Transfer verwendet werden.

3.3.2 Restriktionsverdau und Elektrophorese

Es wurden 10-20 µg der DNA mit 60 U des entsprechenden Enzyms in einem Volumen über Nacht verdaut. Die DNA Proben wurden auf ein 0.8 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 40 V über Nacht aufgetrennt. Das Gel wurde dann mit einem beiliegenden Lineal unter UV-Licht fotografiert.

3.3.3 DNA-Transfer (*Southern Blot*)

Vor dem Transfer wurde die DNA in dem Gel unter leichtem Schütteln für 30 min in einer Denaturierungslösung denaturiert und anschließend zweimal 15 min in einer Neutralisierungslösung neutralisiert. Für den Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wurde eine Blotapparatur, wie in folgender Abbildung dargestellt, aufgebaut:



Der Transfer erfolgt 12-20 h. Anschließend wurden die Geltaschen auf der Membran markiert, die Membran wird abgenommen und auf Filterpapier getrocknet. Die DNA wurde auf der Membran durch UV-Bestrahlung immobilisiert.

3.3.4 Radioaktive Markierung der DNA-Sonden durch „*random priming*“

Mit Hilfe einer radioaktiv-markierten Sonde werden die DNA-Moleküle spezifisch markiert und können anschließend auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Für die Markierung der Sonden mit [α-^{32}P]-dCTP wurde das "*Megaprime DNA labelling system*" der Firma Amersham verwendet. Die DNA-Sonde (50 ng) wurde zusammen mit 10 µl der Primerlösung für 5 min denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 5 µl des 10 x Reaktionspuffers, 2 Einheiten Klenow-Enzym sowie 50 µCi [α-^{32}P]-dCTP zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Endvolumen von 50 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde der Ansatz über Microspin S-300 Säulen (Amersham) aufgereinigt. Um die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Sonde zu bestimmen, wurde 1 µl der aufgereinigten Sonde in 2 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben und in einem Beta-Counter gemessen. Die Sonde sollte eine spezifische Aktivität von mehr als 1 x 10^8 cpm/µg DNS aufweisen und in der Hybridisierungsreaktion in mindestens 1x 10^6 cpm/ml Lösung vorliegen. Anschließend wurden der Sonde 100 µl Lachsspermien-DNA zugegeben, der Ansatz wurde 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt.

3.3.5 Hybridisierung von Membranen

Die Membran wurde zunächst in 5-10 ml "*Rapid-hyb*" Hybridisierungspuffer für 30 min bei 65°C prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde hinzugegeben und die Membran wurde für mindestens 4 Stunden bei 65°C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran in

2x SSC/0.1% SDS bei 65°C gewaschen. Die Radioaktivität der Membran wurde nach dem Waschvorgang mit einem Handmonitor überprüft und gegebenfalls wurde der Waschschritt wiederholt. Anschließend wurde die Membran auf einem Filterpapier getrocknet, mit Klarsichtfolie umhüllt und über Nacht in einer Kassette mit einem Röntgenfilm exponiert. Die Expositionsdauer hängt grundsätzlich von der Stärke des zu erwartenden Signals ab.

3.3.6 Entfernung radioaktiver Sonden von hybridisierten Membranen ("Strippen")

DNA- oder RNA-Sonden, die an die Membran gebunden sind, können entfernt werden, um diese mit einer weiteren Sonde zu hybridisieren. Dafür wurde die zuvor hybridisierte Sonde unter sehr stringenten Bedingungen in 0,1 x SSC bei 95°C von der Membran gewaschen.

3.4 Northern Blot

3.4.1 Elektrophorese im denaturierenden Gel

7-10 µg der RNA-Proben wurden in einem Ladepuffer in einem Gesamtvolumen von 20-25 µl vorbereitet. Dieser Ansatz wurde 5 min bei 60 °C inkubiert und auf das denaturierende Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde eine RNA-*Ladder* (Invitrogen) verwendet. Das RNA-Gel lief für 2-5 h bei 75 V in einfach konzentriertem MOPS-Puffer.

3.4.2 RNA-Transfer (*Northern Blot*)

Nach der Gelelektrophorese wurde die RNA auf eine Nylonmembran transferiert. Der Aufbau erfolgte entsprechend dem Aufbau der *Southern Blot* Transferapparatur (siehe Abbildung unter 3.3). Nach dem Transfer über Nacht wurde die RNA auf der Membran mittels UV-Strahlung fixiert.

3.4.3 Radioaktive Markierung der Sonden

Die radioaktive Markierung der Sonde für die Hybridisierung der Membran des Northern Blots erfolgte wie unter 3.3 beschrieben, nur dass eine Zugabe von Lachsspermien-DNA hier nicht erforderlich war.

3.4.4 Hybridisierung der Membran

Die Membran wurde für 30 min bei 65°C in Hybridisierungs-Röhren in der mit der "Rapid-Hyb"-Hybridisierungs-Lösung (5-10 ml) prähybridisiert. Anschließend wurde die ^{32}P-markierte Sonde dazugegeben und mindestens 2 h hybridisiert. Die Membran wurde dann für 15 min mit 2x SSC bei 65°C gewaschen. Nach diesem Waschschritt wurde die Radioaktivität der Membran mit einem Handmonitor gemessen, und falls erforderlich wurde dieser Waschschritt zwei- bis dreimal wiederholt. Für die Autoradiographie wurden die Membranen in Frischhaltefolie eingewickelt und in einer Röntgenkassette bei Raumtemperatur exponiert.

3.5 Allgemeine proteinchemische Methoden

3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte gemäß der Methode von Lämmli (1970). In eine Elektrophoresekammer wurde ein Trenngel mit einem entsprechend konzentrierten Acrylamid eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol abgeschüttet und auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Ein bestimmtes Volumen der Proteinprobe, etwa 8-16 µl, wurde dann 1:1 mit 2x SDS-Ladepuffer vermischt und anschließend 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Abkühlung wurden die Proben gevortext und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Protein-Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V bis die Proteinproben das Sammelgel durchlaufen hatten und die Bromphenolblau-Wanderungsfront das Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach Größe der zu untersuchenden Proteine und der Konzentration des Acrylamidgels.

3.5.2 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE

Die SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese in einer Coomassielösung über Nacht unter leichtem Schwenken gefärbt. Die Gele wurden anschließend in einer Lösung entfärbt, dabei wurde diese Lösung 3-4-mal gewechselt.

3.5.3 *Western* Blot

Um die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren, wurde die Methode des Tanktransfers verwendet. Für den Transfer der Proteine auf eine Membran wurde eine Nitrocellulose-Membran auf Trenngelgröße zurechtgeschnitten und in 1x Transferpuffer äquilibriert. Der Transfertank wurde mit 1x Transferpuffer gefüllt und in die Blotkammer wurde von der Kathodenseite her ein Schwammtuch, ein feuchtes Whatmann Filterpapier, das Trenngel, die Nitrozellulosemembran, ein feuchtes Whatmann Filterpapier und ein Schwammtuch platziert. Der Transfer erfolgte bei 4°C und 20-40 V für 1-2,5 Stunden.

3.5.4 Immundetektion

Für die Immundetektion wurden die Membranen kurz in 1x PBS gewaschen, zur Blockierung unspezifischer Bindungen der Antikörper in 5% Milchpulver in 1x PBS inkubiert. Daraufhin wurde die Membran für eine Stunde mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 1x PBS/0.1% Tween erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Peroxidase-konjugiert α-mouse, verdünnt 1:1000 in 5% Milchpulver in 1x PBS) für wiederum eine Stunde. Die Membran wurde erneut dreimal mit 1x PBS/0.1% Tween gewaschen und im Dunkeln für eine Minute mit 1 ml frisch hergestellten Luminol/ Wasserstoffperoxid-Gemisch inkubiert. Mit dem erzeugten Chemilumineszenzsignal wurde ein Röntgenfilm je nach Signalstärke belichtet. Die Entwicklung des Films erfolgte dann in Entwicklerlösung bis ein Signal zu erkennen war. Anschließend wurde die Röntgenfilme kurz in H_2O gewaschen und in Fixiererlösung fixiert.

3.6 Arbeiten mit Hefe

3.6.1 Zum Prinzip des *Yeast two-hybrid*-Systems

Das *Yeast two-hybrid*-System dient der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen (Field and Song, 1989). In einem auf Gal4 basierenden *Yeast two-hybrid*-System wird ein so genanntes "Köder"-Protein (*bait*) an die Gal4-DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) fusioniert, während ein anderes Protein als Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) vorliegt. Findet zwischen diesen beiden Proteinen eine Interaktion statt, so werden die DNA-BD und die AD in räumliche Nähe zueinander gebracht und können somit an einer "***u**pstream*

***a**ctivating **s**equence*" (UAS) binden und die Transkription von Reportergenen initiieren (Abbildung 3-1).

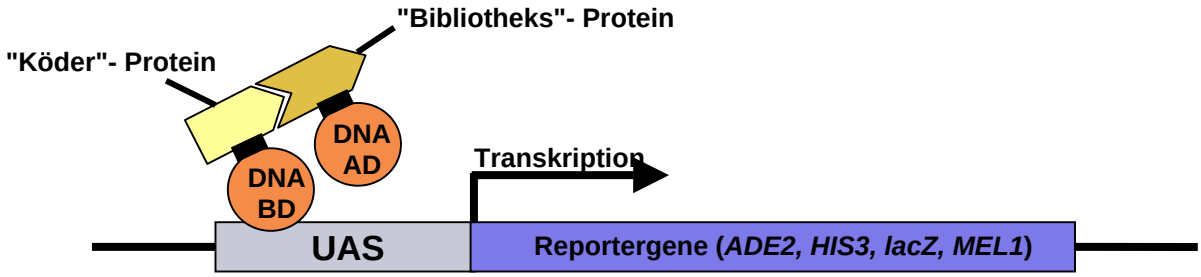


Abbildung 3-1: Das *Yeast two-hybrid*-Prinzip
Das Gal4 Protein ist ein Transkriptionsfaktor, welcher normalerweise die Gene kontrolliert, die für den Galaktosmetabolismus verantwortlich sind. Durch eine Interaktion zwischen "Köder"- und "Bibliotheks"-Protein kann der Gal4-Transkriptionsfaktor (bestehend aus DNA-BD und AD) an der „*upstream activating sequence*" (UAS) binden und dadurch die Transkription der Reportergene (*ADE2, HIS3, lacZ, MEL1*) initiieren.

3.6.2 Hefekulturen

Die Hefestämme AH109 und Y187 wurden von der Firma Clontech gekauft und in YPDA-Vollmedium oder auf entsprechenden Agarplatten bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden in einem Schüttler mit 250 UpM bewegt.
Die mit den Plasmiden pGBKT7 (AH109) oder pACT2 (Y187) transformierte Hefestämme wurden in einem definierten Medium oder den entsprechenden Agarplatten ohne Tryptophan beziehungsweise ohne Leucin kultiviert, die von dem jeweiligen Plasmid synthetisiert werden können. Um nach einer Verpaarung auf die Anwesenheit beider Plasmide zu selektieren, wurden die entsprechenden Kulturmedien ohne Tryptophan und ohne Leucin hergestellt.

3.6.3 Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA

Eine Kolonie des zu transformierenden Hefestammes wurde in 10 µl H_2O resuspendiert und auf einer YPDA-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Kolonien wurden am nächsten Tag mit einem Zellschaber von der Platte gekratzt (entsprechend einem Volumen von etwa 20 µl) und in 1 ml H_2O resuspendiert und 3 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 500 µl LiAc resuspeniert und 15 min in einem 30°C Wasserbad inkubiert. Die Hefekulturen wurden erneut pelletiert und es wurden 350 µl Hefe-Transformationspuffer zugegeben und kräftig gevortext. Dieser Ansatz wurde 30 min in einem 30°C Wasserbad inkubiert und anschließend 20 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Der Transformationsansatz wurde 15 sec zentrifugiert, der Überstand

wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml H_2O resuspendiert. Davon wurden 100 µl auf eine entsprechende Agarplatte ausplattiert und bei 30°C inkubiert.

3.6.4 Verpaarung von Hefen in kleinem Maßstab

Von jedem der beiden zu verpaarenden Hefestämme wurde eine frische Einzelkolonie verwendet, um mit diesen beiden Kolonien gemeinsam 0,5 ml zweifachen YPDA-Medium in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß anzuimpfen. Der Ansatz wurde gründlich durchmischt und unter Schütteln mit 250 UpM für 8 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Hefen wurden einmal in ddH_2O gewaschen, in 100 µl H_2O resuspendiert und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf geeignete Selektionsplatten ausgebracht.

3.6.5 Verpaarung mit dem prätransformierten Hefestamm

Von dem AH109 Hefestamm, der das "Köder"- Plasmid pGBTK7_R2_cy trägt, wurde eine 50 ml Übernachtkultur in SD-Medium ohne Tryptophan vorbereitet. Mit Erreichen einer OD_{600} von 0,8 wurden die Hefen für 5 Minuten bei 1000 x g pelletiert, in 50 ml zweifach konzentriertem YPDA-Medium resuspendiert und mit einem unmittelbar zuvor aufgetauten Aliquot der in Y187 prätransformierten cDNA-Biliothek vereinigt. Dieser Ansatz wurde in einem 2 l-Erlenmeyerkolben unter langsamen Schütteln (30 bis 35 UpM) für 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Hefekultur für 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert Der Erlenmeyerkolben wurdn noch zweimal mit 2-fachem YPDA-Medium ausgespült. Die Hefepellets wurden zusammengeführt und in 10 ml 0.5-fachem YPDA/Kanamycin-Medium resuspendiert. Jeweils 200 µl dieses Ansatzes wurde auf insgesamt 50 Agarplatten mit einem Durchmesser von 15 mm, die aus einem definierten Medium ohne Tryptophan, Leucin, Adenin und Histidin hergestellt wurden, verteilt. Diese Platten wurden für 10 Tage bei 30°C inkubiert und das Wachstum neuer Kolonien wurde täglich überprüft.

3.6.5 Berechnung der Verpaarungseffizienz

Zur Bestimmung der Verpaarungseffizienz wurden vor dem Ausplattieren auf Selektionsplatten 10 µl des jetzt in einfach konzentriertem YPDA-Medium resuspendiertemVerpaarungsansatzes entnommen. Davon wurden drei Verdünnungen (1:100, 1:1000, 1:10000) in YPDA-Medium hergestellt. Jeweils 100 µl dieser Verdünnungen wurden auf leucinfreie und auf tryptophan- und leucinfreie Agarplatten ausgebracht. Die Platten

wurden für zwei Tage bei 30°C inkubiert und Kolonien wurden auf den Platten der geeigneten Verdünnungsstufe gezählt. Wir definierten die Verpaarungseffizienz als den Anteil der verpaarten Bibliothekshefen an der Gesamtzahl der Bibliothekshefen einschließlich verpaarter Bibliothekshefen und ermittelten diese Größe als den Quotienten der Anzahl auf tryptophan- und leucinfreien Platten wachsenden Kolonien durch die Anzahl auf leucinfreien Platten derselben Verdünnungsstufe wachsenden Kolonien.

3.6.6 Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe

Eine 1,5 ml Übernachtkultur wurde pelletiert und in 300 µl Hefe-Lyselösung (STES-Puffer) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Glasperlen (Sigma) wurden die Ansätze für eine Minute kräftig gemixt und anschließend mit 300 µl Phenol/Chloroform extrahiert. Die obere Phase wurde mit 2 Volumen Ethanol versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde 10 min zentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 10 µl H_2O aufgenommen. 5 µl dieser DNA-Lösung wurden für die Elektroporation in elektrokompetente *E. coli* eingesetzt.

3.7 Expression von Glutathion S-Transferase (GST)- Fusionsproteinen

3.7.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in *Escherichia coli*

Das Glutathion S-Transferase (GST) Genfusions System wird angewendet, um Fusionsproteine in *Escherichia coli* zu exprimieren, aufzureinigen und zu detektieren. Das System basiert auf der induzierbaren Expression von Genen oder Genfragmenten als Fusion mit *Schistosoma japonicum* GST (Smith und Johnson, 1988). Die Expression in *E. coli* resultiert dann in einem Fusionsprotein mit dem GST am Aminoterminus und dem Protein von Interesse am Carboxyterminus. GST-Fusionsproteine werden dann von den Bakterienlysaten durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion Sepharose-Kügelchen aufgereinigt. Die Fusionsproteine können dann mit immunologischen Methoden detektiert werden.

Mit einer einzelnen *E. coli* Kolonie, die das rekombinante Plasmid enthält, wurden 3 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37° C unter starkem Schütteln inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurden 50 ml vorgewärmten LB-Medium zugegeben und weiter bei 37 °C inkubiert

bis die Kultur eine optische Dichte bei OD_{600} 0.5-1 erreicht. 120 µl 0.8 M IPTG wurde hinzugegeben (Endkonzentration 0.1mM) und die Inkubation für 4 Stunden fortgesetzt. Die Kultur wurde anschließend mit 7700 x g für 5 min bei 4° C zentrifugiert, mit 3 ml STE-Lösung gewaschen und erneut pelletiert. Das Pellet wurde dann in in 3 ml STE/Lysozym (100 µg/ml, frisch angesetzt)/Protease Inhibitor (Roche), gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden 450 µl STE Lösung mit Sarkosyl (1,5 % Endkonzentration) zugegeben und nach kräftigem Mischen wurden die Zellen außerdem Ultraschall ausgesetzt. Dieser Ansatz wurde 5 min mit 10000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 700 µl Triton X-100 (Endkonzentration 2 %) in STE-Lösung versetzt.

3.7.2 Aufreinigung des GST-Fusionsproteins

Zunächst wurde die Glutathion Sepharose 4B für die Aufreinigung vorbereitet, indem sie aus dem Aufbewahrungsmedium entnommen und für 5 min bei 500 x g sedimentiert wurde. Die Glutathion Sepharose 4B wurde dann mit 10 ml 1 x PBS (4° C) gewaschen und erneut bei 500 x g für 5 min sedimentiert. Zu 1.33 ml Ausgangsmenge der Glutathion Sepharose 4B wurde 1 ml 1x PBS hinzugegeben, um das benötigte 50 %ige Gemisch zu erhalten. Dieses Gemisch konnte bis zu einem Monat bei 4°C aufbewahrt werden.
2 ml dieser Glutathion-Sepharose-Lösung wurden zu 100 ml der ursprünglichen bakteriellen Kultur hinzugegeben und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur unter leichten Hin- und Herschwenken inkubiert. Das Medium wurde mit dem 10-fachen Volumen 1 x PBS gewaschen und bei 500x g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und gegebenfalls für spätere Analyse aufbewahrt. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Das an die Sepharose gebundene Protein wurde anschließend mit 1 ml Eluierungspuffer für 10 min bei Raumtemperautur unter vorsichtigem Schwenken eluiert. Das Medium wurde durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min sedimentiert. Der Eluierungsvorgang wurde zweimal wiederholt und die Eluate zusammengeführt. Die eluierten Proteine konnten in 10 % Glycerol bei -80°C aufbewahrt werden.

3.8 *In vitro* Transkription/Translation

Mit dem "TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System" von Promega können Proteine in einem Kaninchen-Retikulocytenlysat *in vitro* durch gekoppelte Transkription und Translation hergestellt werden.

Die Reagenzien des "TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System" von Promega wurden schnell aufgetaut und dann auf Eis aufbewahrt. Folgender Reaktionsmix mit einem Endvolumen vom 50 µl wurde dann angesetzt:

TNT® Quick Master Mix	40 µl
[^{35}S] Methionin (1,000 Ci/mmol bei 10m Ci/ml)	2 µl
Plasmid DNA (0.5 µg/µl)	2 µl
H_2O	6 µl

Dieser Reaktionansatz wurde bei 30 °C für 60-90 min inkubiert. Detaillierte Angaben können dem Handbuch (Technical Bulletin No. 126, Promega) entnommen werden.

3.9 GST-*pull-down*

Bei einem GST-*pull-down* können Proteine, die synthetisiert und radioaktiv markiert wurden, als Probe verwendet werden, um die mögliche Interaktion mit einem Partner, welches als GST-Fusionsprotein expremiert wurde, *in vitro* nachzuweisen (Abbildung 3-2).

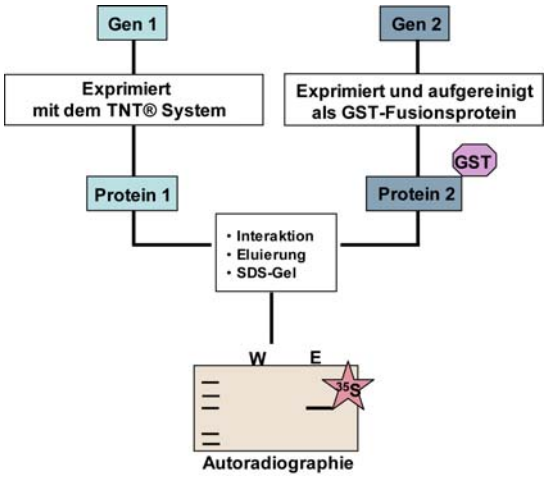


Abbildung 3-2: Analyse von Protein-Protein Interaktionen unter Verwendung des TNT Sytems und GST-Fusionssystems.
Die Abbildung zeigt, dass Protein 1 mit [^{35}S] - Methionin in einer TNT®-System-Reaktion markiert wird. Das vermutliche Partnerprotein 2 wird exprimiert und aufgereinigt und über die GST-Fusion an Sepharose gebunden, die dann mit der TNT® Reaktion vermischt wird. Die Sepharose wird anschließend gewaschen, um ungebundene Proteine (W) zu entfernen. Die übrigen gebunden Proteine (E) werden eluiert und über ein SDS-Gel mit anschließender Autoradiographie analysiert

3.9.1 Inkubation mit GST-Fusionsprotein

Für den GST-*pull-down* wurden 25 µl Glutathion-Sepharose-Kügelchen, die das Fusionsprotein oder die Kontrollen gebunden haben, mit 15 µl des *in vitro* Transkriptions-/Translationsansatzes für 2 h bei 4°C in 200 µl GST-*pull-down*-Puffer unter leichtem Schwenken inkubiert. Diese Ansätze wurden für 3 min bei 13000 rpm pelletiert und viermal

mit 200 µl Pulldown-Puffer gewaschen. Diese Ansätze wurden mit 20 µl 1x SDS-Ladepuffer versetzt und wurden dann auf ein Gel aufgetragen. Das Gel wurde dann in 25 % Ethanol/10 % Essigsäure fixiert, getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert.

3.10 Expressionsanalyse mittels *Microarray*-Technologie

Die Herstellung der Microarrays und die Etablierung der folgenden Methoden und dazugehörigen Protokolle erfolgten in der *Microarray*-Arbeitsgruppe des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, München.

3.10.1 Isolation von RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit dem TRIzol® Reagenz von Invitrogen unter Verwendung des dazugehörigen Protokolls isoliert. Die "TRIzol® Methode" orientiert sich an der Phenol/Guanidiniumisthiocynat-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987). Hierfür werden die entnommenen Gewebe oder die Zellen mit einer geeigneten Methode homogenisiert. Dafür wurde bei Geweben entweder ein Homogenisator (Ultraturrax) oder ein Mörser in einer Schale auf flüssigem Stickstoff verwendet. Zellen oder kleinere Gewebe wurden direkt im TRIzol® aufgenommen und durch wiederholtes Auf – und Abpipettieren homogenisiert. Das detailierte Protokoll kann der Produktbeschreibung des TRIzol® Reagenz (Katalog No. 15596, Invitrogen) entnommen werden. Im Anschluß an die Isolation wurde das RNA-Pellet getrocknet und in einer entsprechenden Menge Ampuwa-Wasser aufgenommen. Der RNA-Reinheitsgrad wurde bestimmt und die Quantifizierung der Gesamtmenge erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben. Die RNA wurde bei -70°C aufbewahrt.

3.10.2 RNA-Amplifizierung

Um die erforderliche RNA-Menge, die für das *Microarray*-Experiment benötigt wurde, bereitzustellen, wurde die Ausgangs-RNA mit dem "Amino Allyl MessageAmp™ aRNA Kit" von Ambion amplifiziert. Dieses System basiert auf einem Protokoll, welches im Labor von Eberwine entwickelt wurde (Van Gelder et al., 1990). Zuerst wird die RNA mit einem oligo (dT)-Primer, der eine T7 Promotorsequenz enthält, revers transkribiert, um anschließend mit einer T7 RNA Polymerase durch *in vitro* Transkription amplifiziert zu werden. Es entsteht die sogenannte aRNA. Während dieser *in vitro* Transkription wird das modifizierte Nukleotid, 5-

(3-Aminoallyl)-UTP eingebaut. An dessen reaktiver Aminogruppe an der C5 Position des Uracils wird dann das N-Hydroxysuccinimidylester Derivat reaktiver Farbstoff (Cy3 oder Cy5) chemisch gekoppelt.
Die cDNA Synthese, *in vitro* Transkription und die Farbstoffkopplung erfolgte nach dem Protokoll, welches in der Bedienungsanleitung des "Amino Allyl MessageAmp™ aRNA Kit" (Version 0302) ausführlich beschrieben ist. Im Anschluß an die Amplifizierung wurde die RNA quantifiziert und konnte dann für das *Microarray*-Experimente verwendet werden.

3.10.3 Herstellung der *Microarrays*

Der cDNA *Microarray* umfasst 18.856 PCR-Produkte von verschiedenen Maus cDNA Bibliotheken (Research Genetics, RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung), die 12037 verschiedene *Unigene Cluster* repräsentieren. Die PCR Produkte wurden mit dem Chipwriter Pro spotting Roboter und 48 SMP3 Nadeln (Telechem) auf GAPS II (Corning) Objektträger aufgetragen. Anschließend wurden die *Microarrays* 10 Sekunden bei 80°C erhitzt und mit UV-Strahlung fixiert. Die Objekträger wurden 30 min bei 65°C blockiert, 1 h bei 42°C prähybridisiert (in 0.1 mg/ml BSA, 50% Formamid, 5 x SSC and 0.1 x SDS) und danach in Wasser und Isopropanol in 50 ml Falcon Röhrchen gespült. Getrocknet wurden die *Arrays* durch Zenrifugation für 2 min bei 400 x g.

3.10.4 *Microarray*-Hybridisierung

Die *Arrays* wurden in einer Prähybridisierungslösung für 60 min in einem Wasserbad bei 42°C prähybridisiert. Anschließend wurden die *Arrays* mit H_2O und Isopropanol gewaschen und durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 2 min in 50 ml Falcon-Röhrchen getrocknet. 20 µg amplifizierte RNA gekoppelt an Cy3 oder Cy5 NHS-Ester wurde mit 48 µl Hybridisierungspuffer und 2 µl poly (dA) zusammengefügt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Der Ansatz wurde dann auf die Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen vorsichtig abgedeckt. Die *Microarray*-Hybridisierung wurde dann in einer dafür eigens hergestellten Kammer in einem Wasserbad bei 50°C über Nacht inkubiert. Die Deckgläschen wurden entfernt und die *Arrays* in 2x SSC/0.1% SDS bei Raumtemperatur gespült. Anschließend wurden folgende Waschschritte augeführt: in 2x SSC/0.1% SDS bei 42°C für 5 min im Wasserschüttelbad, in 0.1x SSC/0.1% SDS bei Raumtemperatur für 10 min, viermal in 0,1x SSC bei Raumtemperatur für 1 min und in 0,01x SSC bei Raumtemperatur indem die Objektträger für 10 Sekunden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen

geschüttelt wurden. Danach wurden die *Microarrays* durch Zentrifugation für 2 min bei 400 x g in 50 ml Falcon-Röhrchen getrocknet.

3.10.5 Scannen der *Microarrays*

Das *Microarrays* wurden im ScanArray 4000 Laserscanner und mit der ScanArray 3.1 Software (Perkin Elmer) mit einem fixen "PMT (*Photomultipler tube*) *gain*" von 80 % und einer Laserintensität, die je nach Signalintensität eingestellt wurde, eingescannt. Die Quantifizierung der Daten erfolgte mit der QuantArray Software 2.1.00 (Perkin Elmer) und der "*fixed circle_analysis*" Methode. Für die Extraktion des Spotbilds wurde die Helligkeit der *Microarray*-Bilder global normalisiert, so daß der Mittelwert der Spotintensität der gesamten *Arrays* derselbe war. Anschließend wurden die Koordinaten, die während des Quantifizierungsprozess generiert wurden, verwendet, um die entsprechenden Spots von jedem *Array*-Bild auszuschneiden. Diese Bilder wurden dann zusammengefügt und von der 16 bit Grauskala in 8 bit RGB-Farben transferiert (Cy3 grüner Kanal, Cy5 roter Kanal). Diese Bilder wurden überlagert und die Bereiche für die Spotaquisition wurden mit einem blauen Kreis markiert. Diese Bilder für Cy3 und Cy5, der Überlagerung und der Überlagerung plus dem Aquisitionsbereich wurden zusammengefügt und im "Portable Network Graphics (PNG)" Format gespeichert.

3.10.6 Datenanalyse

Die Rohdaten wurden entsprechend der Prozedur, die in Yang et al. (2002) beschrieben wurde, normalisiert und mit einem t-Test auf statistische Signifikanz in Hinblick auf differentielle Expression getestet. Die p-Werte wurden dann durch multiples Testen unter Verwendung der "Benjamini-Hochberg's false discovery rate (FDR)" Prozedur korrigiert (Hochberg, 1995). Ein weiteres statistisches Kriterium ist der *accept2*. Dieser ergibt sich aus dem Z-score (log2 [ratio] der mittleren Expressionswerte/Standardabweichung) und aus dem Expressionsunterschied der Gene. Für diese Werte wurde ein Schwellenwert festgelegt. Liegt *accept*2 über diesem definierten Schwellenwert, dann ist *accept*2=true, ansonsten ist *accept*2=false.

3.11 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Mit der quantitativen *real-time* PCR können spezifische Nukleinsäuresequenzen sensitiv amplifiziert und durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff quantifiziert werden. Als Startmaterial wurde hier cDNA verwendet, in die während der Amplifikation in dem Lightcycler-System von Roche der Farbstoff SYBR Green eingebaut wurde. Die Quantifzierung erfolgte mit der Roche Software und der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Methode (Livak und Schmittgen, 2001)

3.11.1 Reverse Transkriptase (RT-) PCR

Zuerst wurden die RNA (1 µg), 1 µl Oligo (dT)-Primer (0.5 µg) zu einem 10 µl RT (Reverse Transkription)-PCR Ansatz zusammenpipettiert, für 1 min bei 65 °C inkubiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden dem Ansatz folgende Komponenten hinzugegeben:

5x First-strand Puffer	4 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
0.1 M DTT	2 µl

Nachdem dieser Reaktionsansatz für 1-2 min bei 42 °C inkubiert wurde, fügte man 1 µl SUPERSCRIPT II RT und setzte die Inkubation für 60 min bei 42 °C fort. Die Reaktion wurde anschließend für 15 min bei 70 °C inaktiviert.

3.11.2 RNase H Behandlung

Um RNA zu entfernen, die noch komplementär an die cDNA gebunden ist, kann eine RNase Behandlung durchgeführt werden. Hierfür wurde der RT-PCR Ansatz für 20 min bei 37 °C mit 1 µl (2U) RNase H inkubiert und die Reaktion wurde anschließend 15 min bei 70°C gestoppt.

3.11.3 Amplifikation der cDNA im LightCycler

Für die PCR im LightCycler wurde folgende Reaktion mit dem Kit "LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I" von Roche angesetzt:

0,5 µl	sense Primer (0,8 pmol/µl)
0,5 µl	antisense Primer (0,8 pmol/µl)
5 µl	Reaktionsmix
3 µl	H_2O

Dieser Ansatz wurde in die Glaskapillaren, die sich im Lightcycler Karusell befinden, pipettiert und anschließend wurden 2 µl der cDNA hinzugegeben. Das Karusell wurde kurz zentrifugiert. Folgendes Programm wurde für die PCR verwendet:

				Messung
Denaturierung:	95°C	15 min	1 Zyklus	keine
Amplifikation:	95°C	15 sec	45 Zyklen	keine
	55°C	20 sec		keine
	72°C	25 sec		einfach
Schmelzkurve:	95°C	0 sec		keine
	65°C	15 sec	1 Zyklus	keine
	95°C	0 sec		fortlaufend
Kühlen:	30°C			keine

3.11.4 Relative Quantifizierung

Bei der Methode der relativen Quantifizierung können Expressionsunterschiede eines Gens, dem sogenannten Zielgen, nachgewiesen werden. Hierfür wird die Expressionsstärke dieses Gens relativ zur Expression eines Haushaltsgens bestimmt und kann dann zwischen verschiedenen Proben verglichen werden.

Der relative Expressionsunterschied wurde mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Methode berechnet. Die C_T-Werte stellen den sogenannten "*Treshold Cycle*" dar und wurden mit der "*Second Derivative Maximum*"-Methode der LightCycler Software bestimmt.

ΔC_T [Probe]	$= C_{T\ Zielgen} - C_{T\ Haushaltsgen}$
ΔC_T [Kontrolle]	$= C_{T\ Zielgen} - C_{T\ Haushaltsgen}$
$2^{-\Delta\Delta CT}$	$= \Delta C_T$ [Probe] - ΔC_T [Kontrolle]

Um vergleichbare Daten zu erhalten, wurde die Amplifikationseffizienz jeder PCR-Reaktion bestimmt. Die cDNA wurde dafür 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Die Effizienz E wird mit $E=10^{-1}$/Steigung von der LightCycler Software berechnet. Eine Effizienz über 1.8 (das entspricht 80 %) wurde als ausreichend betrachtet. Für die Datenerhebung wurden die Experimente in Triplikaten an drei unabhängigen Tagen durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine Probe verwendet, bei der die cDNA Synthese ohne reverse Transkriptase erfolgte (-RT-Kontrolle). Außerdem wurde nach jeder Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die Spezifität der Reaktion gezeigt werden und die Bildung von Primerdimeren ausgeschlossen werden konnte.

3.11.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden anschließend mit dem Mann-Whitney-U-Test auf statistische Signifikanz geprüft.

3.12 *In situ* Hybridisierung

3.12.1 Radioaktive Markierung der Sonde

Linearisierte und aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit folgendem Ansatz durch *in vitro* Transkription radioaktiv markiert (Gesamtvolumen 30 µl):

1,5 µg	linearisierte Plasmid-DNA
3 µl	10x Transkriptionspuffer
3 µl	NTPs (10 mM rATP, rCTP, rGTP)
1 µl	0,5 M DTT
1 µl	RNase Inhibitor (40 U/µl, Roche)
3 µl	[α-thio-^{35}S]-UTP (12,5 mCi/mM, Amersham)

1 µl	T7 oder T3 Polymerase (20 U/µl)

Dieser Ansatz wurde für insgesamt 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurde noch 0,5 µl der entsprechenden Polymerase hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz mit 2 µl DNaseI für 15 min bei 37°C verdaut. Für die Aufreinigung wurde das RNeasy Minikit von Qiagen verwendet, das Protokoll kann dem Handbuch (RNeasy Mini Handbook 06/2001, S. 79) entnommen werden.
Um die Menge der eingebauten Radioaktivität zu bestimmen, wurde 1 µl des Ansatzes in 2 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben und in einem Beta-Counter gemessen.

3.12.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Die Gehirne wurden nach der Entnahme sofort auf Aluminiumfolie transferiert, die auf Trockeneis gelegt wurde. Die so gefrorenen Gewebe konnten bei -80 °C für längere Zeit gelagert werden.
Vor dem Schneiden wurden die gefrorenen Schnitte auf einem metallenen Präparathalter mit Hilfe von Einbettmedium befestigt. Die Gehirne wurden in einem Cryostat bei -14°C bis -20°C in einer Dicke von 16-20 µm geschnitten und nach dem Aufziehen auf den Objektträger auf einer Wärmeplatte bei 37°C getrocknet. Die so hergestellten Schnitte wurden in Plastikboxen bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

3.12.3 Vorbehandlung der Gefrierschnitte

Die Objekträger mit den Schnitten, die bei -20°C aufbewahrt wurden, wurden 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit folgenden Lösungen (je 250 ml) vorbehandelt:

1.	10 min	4 % PFA/PBS (4°C)
2.	3 x 5 min	PBS/DEPC
3.	10 min	0,1 M Triethanolamine-HCl (pH 8.0)
4.	2 x 5 min	2x SSC/DEPC
5.	1 min	60 % Ethanol/DEPC
6.	1 min	75 % Ethanol/DEPC
7.	1 min	95 % Ethanol/DEPC

8.	1 min	100 % Ethanol
9.	1 min	$CHCl_3$
10.	1 min	100 % Ethanol
11.	1 min	95 % Ethanol/DEPC

Bis zur Hybridisierung wurden die Objekträger für etwa 1 h bei Raumtemperatur getrocknet.

3.12.4 Hybridisierung der Gefrierschnitte

Der Hybridisierungsmix wird mit der radioaktiven Sonde gemischt (35000-70000 cpM/µl). Der Ansatz wurde für 2 min bei 95°C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt. Auf einen Objektträger wurden 90 µl Hybridisierungslösung aufgetragen und anschließend wurden diese bei 55°C über Nacht in einem Ofen hybridisiert.

3.12.4 Waschen der Gefrierschnitte nach der Hybridisierung

Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit folgenden Lösungen gewaschen:

1.	4 x 5 min	RT	4x SSC
2.	20 min	37 °C	NTE (20µg/ml RNaseA)
3.	2 x 5 min	RT	2x SSC/1 mM DTT
4.	10 min	RT	1x SSC/1 mM DTT
5.	10 min	RT	0,5x SSC/1mM DTT
6.	2 x 30 min	64 °C	0,1x SSC/1 mM DTT
7.	2 x 10 min	RT	0,1x SSC
8.	1 min	RT	30 % Ethanol in 300 mM NH_4OAc
9.	1 min	RT	50 % Ethanol in 300 mM NH_4OAc
10.	1 min	RT	70 % Ethanol in 300 mM NH_4OAc
11.	1 min	RT	95 % Ethanol
12.	2 x 1 min	RT	100 % Ethanol

Die Objekträger wurden anschließend getrocknet und in einer Röntgenkassette exponiert. Die Dauer war abhängig von der Sonde und der Expressionsstärke des Gens.

3.12.4 Entwickeln

Für die Entwicklung wurden die Objektträger zunächst in eine Fotoemulsion getaucht (Kodak) und über Nacht getrocknet. Je nach Signalstärke wurden die Objektträger dann 1-6 Wochen bei 4°C in einer Trocken-Box mit der Emulsion inkubiert. Für die Entwicklung wurden die Objektträger zunächst 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann in eine Entwicklerlösung (Kodak) getaucht und 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie 30 sec in Wasser gespült und für 7 min in einer Fixierlösung (Kodak) fixiert. Zum Schluss wurden die Objektträger für 25 min unter fließend kaltem Wasser gespült und die restliche Emulsion wurde von der Rückseite mit einer Rasierklinge abgeschabt.

3.12.5 Kresyl-Violettfärbung

Die Schnitte wurden anschließend mit Kresyl-Violett wie folgt gefärbt:

1.	10-15 min	Kresyl-Violett
2.	2 min	Wasser
3.	2x 2 min	70 % Ethanol
4.	15-30 sec	96 % Ethanol/Essigsäure
5.	2x 1 min	96 % Ethanol
6.	2x 2 min	100 % Ethanol
7.	2x 5 min	Xylol

Nach der Färbung wurden die Schnitte mit DPX-Einbettmedium bedeckt und mit einem Deckgläschen verschlossen.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der *Microarray*-Analyse

4.1.1 Expressionsanalyse der konventionellen und konditionalen CRH-R1 Mausmutanten

Um neue Kandidatengene zu identifizieren, deren Expression durch CRH-abhängige Signalmechanismen reguliert wird, wurde die *Microarray*-Technologie eingesetzt. Hierfür wurde das Expressionsprofil spezifischer Regionen von konventionellen und konditionalen CRH-R1 Mausmutanten und Wildtyp-Mäusen miteinander verglichen (Tabelle 4.1-1).

CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre (Müller et al., 2003)	**CRH-R1$^{-/-}$ Knockout** (Timpl et al., 1998)
Hippokampus	Hippokampus
Amygdala	Hypophyse
Hypothalamus	

Tabelle 4.1-1: Regionen der CRH-R1 Mausmutanten, die mit der *Microarray*-Technologie miteinander verglichen wurden.

Aus diesen Geweben wurde RNA von sechs Tieren je Gruppe isoliert, amplifiziert, mit Cy3 bzw. Cy5 markiert und dem 17k bzw. 21k MPIP-*Microarray* (*Microarray* Arbeitsgruppe, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) hybridisiert. Die 17.000 Spots des *Microarray*-Chips repräsentieren etwa 12.000 Gene. Als Referenz wurde das jeweilige Wildtyp-Gewebe verwendet. Um den Einfluß technischer Varianz zu reduzieren, wurden für jede Region jeweils fünf *Microarrays* mit Cy3 und Cy5 markierter cDNA hybridisiert. Anschließend wurden die *Arrays* eingescannt und ausgewertet.

Die Genexpressionsprofile der Knockout- und Wildtyp-Mäuse wurden miteinander verglichen. Die Gene wurden dann als signifikant differentiell exprimiert angesehen, wenn eine der folgenden statistischen Kriterien erfüllt war: p-Wert < 0.05 oder *accept2=true*[1].

[1] *Accept2* ergibt sich aus dem Z-score (log2 [ratio] der Residuen/Standardabweichung) und aus dem Expressionsunterschied der Gene. Für diese Werte wurde ein Schwellenwert festgelegt (Siehe Abbildungen 4.1-1 A-D). Liegt *accept2* über diesem definierten Schwellenwert, dann ist accept2=true, ansonsten ist accept2=false.

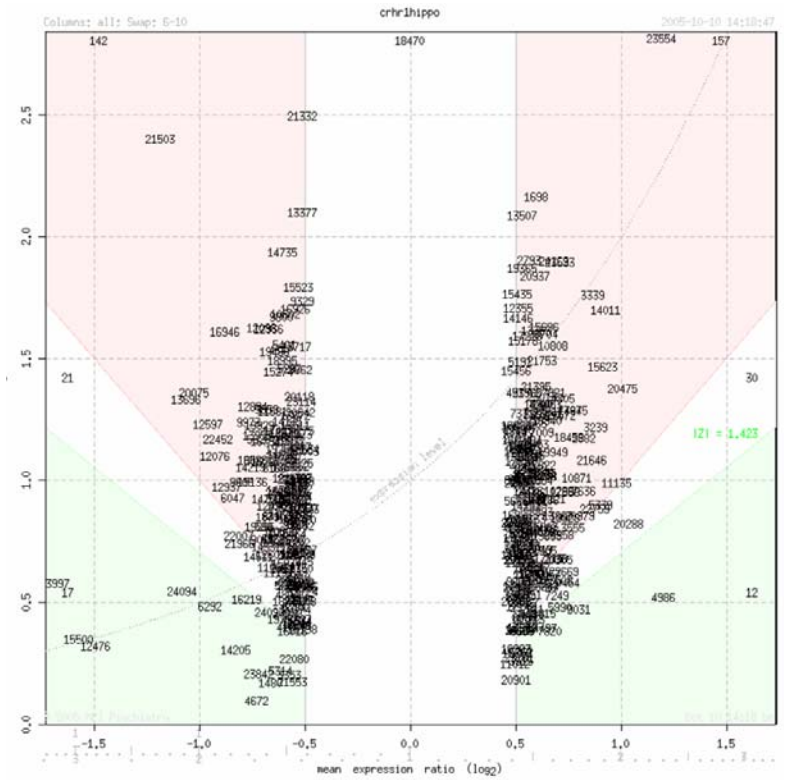


Abbildung 4.1-1 A: *Microarray*-Analyse des Hippokampus der konventionellen CRH-R1$^{-/-}$ Knockout-Mauslinie

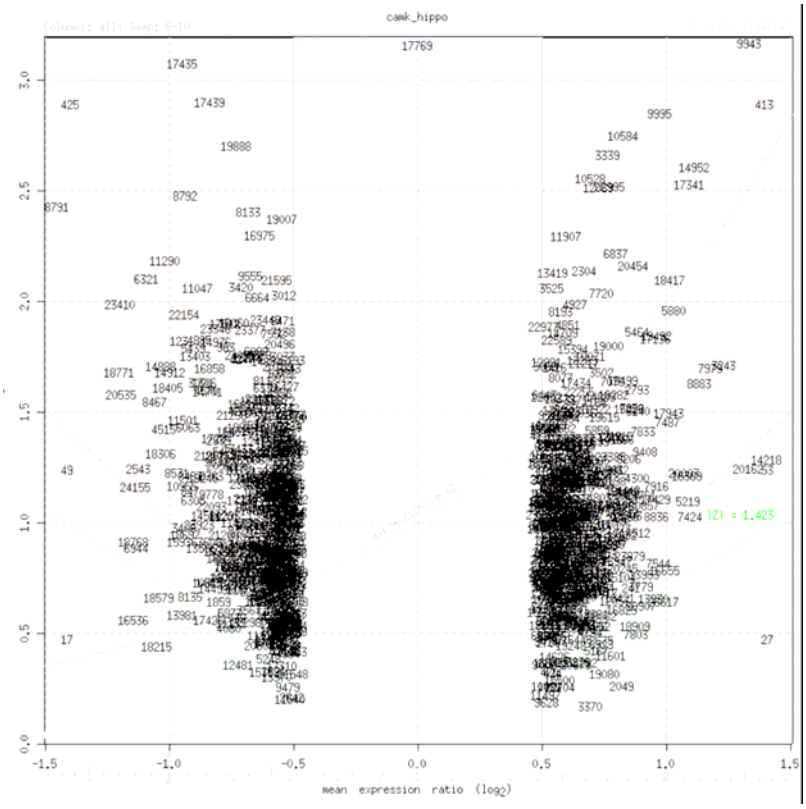


Abbildung 4.1-1 B: *Microarray*-Analyse des Hippokampus der konditionalen CRH-R1$^{-/-}$ Knockout-Mauslinie

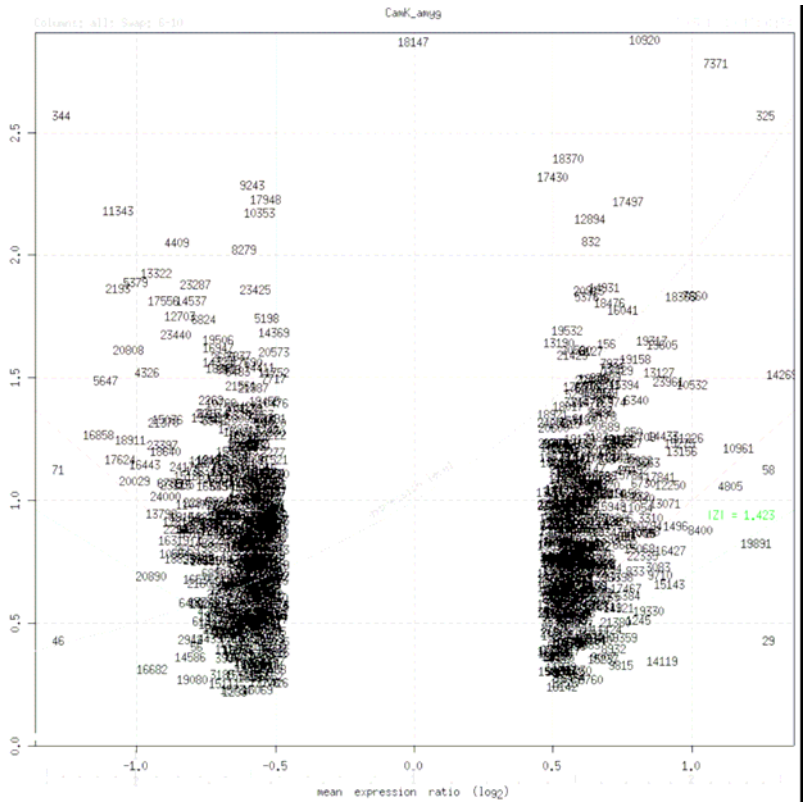


Abbildung 4.1-1 C: *Microarray*-Analyse der Amygdala der konditionalen CRH-R1 Knockout-Mauslinie

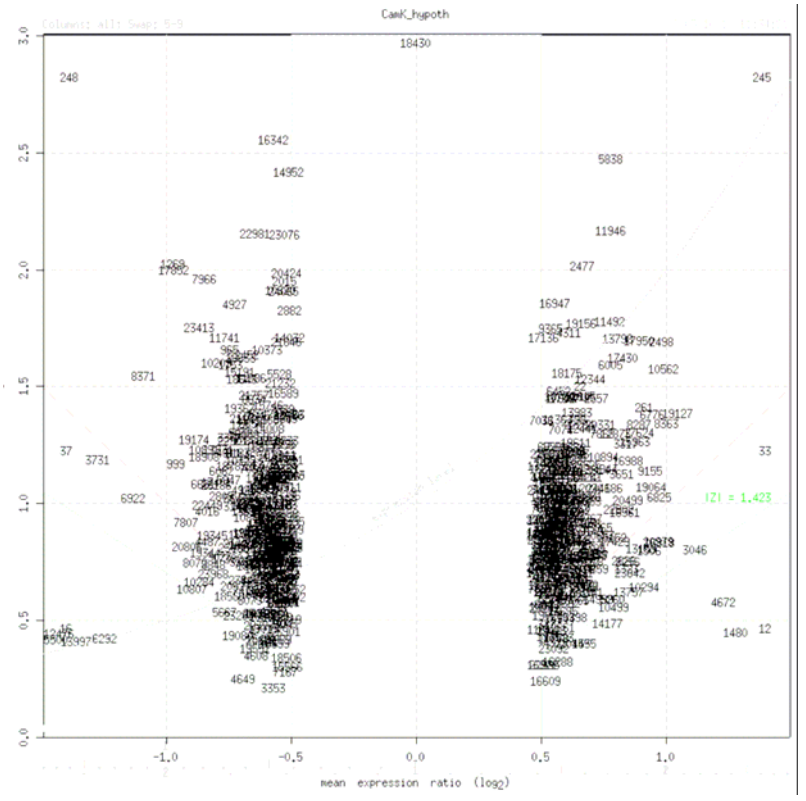


Abbildung 4.1-1 D: *Microarray*-Analyse des Hypothalamus der konditionalen CRH-R1 Knockout-Mauslinie

Abbildung 4.1-1 A-D: Graphische Darstellung der *Microarray*-Analyse.
Die x-Achse beschreiben den logarithmischen Wert der Residuen (m) (diese ergeben sich aus den tatsächlichen Expressionswerten zur nichtlinearen Regressionskurve, die zur Normalisierung verwendet wurde, und werden nach einem lokal angepassten Algorithmus berechnet). Die y-Achse zeigt die Standardabweichung (s) dieser Residuen. Außerdem ist der Bereich, in dem sich die Kandidatengene, für die der festgelegte Z-Score (|Z|=m/s) gilt, grün unterlegt.

Wir konnten insgesamt 564 Gene in den untersuchten Regionen beider Mauslinien identifizieren, die in den CRH-R1 Mutanten signifikant stärker oder schwächer exprimiert waren (Tabelle 4.1-2).

In der Amygdala der konditionalen Knockout-Mäuse war das Genexpressionprofil mit 303 Genen, davon 133 ESTs (*Expressed Sequence Tags*), am stärksten verändert. Im Hippokampus dieser Mausmutanten war die Expression von 75 Transkripten, davon 40 ESTs, differentiell reguliert. Im Hypothalamus war die Transkription von insgesamt 47 Kandidaten, darunter 11 ESTs, verändert.

Bei den konventionellen CRH-$R1^{-/-}$ Knockout-Mäusen wurden im Hippokampus 50 Gene, davon 16 ESTs, und in der Hypophyse 89 Gene, davon 33 ESTs, differentiell exprimiert. Die Expressionsunterschiede lagen zwischen -3.2- und +2.4-fach, bei etwa 20-50 % dieser Gene lag dieser Unterschied über 1.5-fach. Die Zahl der signifikant stärker oder schwächer exprimierten Gene verteilte sich insgesamt sehr gleichmäßig (48.4 % bzw. 51.6 %). Eine Übersicht dieser Gene befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Anhang 6.1).

Mausmutante	Region	Zahl der Gene*	davon ESTs	> 1.5**
CRH-$R1^{-/-}$	Hippokampus	50	16	23
	Hypophyse	89	33	22
CRH-$R1^{loxP/loxP}$ CamkIIα-Cre	Hippokampus	75	40	30
	Amygdala	303	133	55
	Hypothalamus	47	11	19

Tabelle 4.1-2: Zusammenfassung der signifikant veränderten Genexpression der jeweiligen Hirnregion.
*p-Wert < 0.05 oder accept2=true; **Anzahl der Gene bei denen der Expressionsunterschied > [± 1.5-fach] war

4.1.2 Vergleich der Expressionsprofile

Vergleicht man die Expressionsprofile der verschiedenen Regionen der zwei Mauslinien miteinander, so konnten 27 statistisch signifikante Gene gefunden werden, die in zwei oder mehreren Regionen differentiell exprimiert wurden (Tabelle 4.1-3). In den konditionalen

CRH-R1 Knockout-Mäusen war die Expression der Gene Oxr1 und Hbb-b1 in Hippokampus, Amygdala und Hypothalamus reguliert. Insgesamt 16 weitere übereinstimmende Gene waren in zwei der Hirnregionen der konditionalen Mausmutanten differentiell, davon 9 Gene entgegengesetzt, reguliert. Vergleicht man die Expressionsprofile der zwei Mauslinien, so gibt es 5 übereinstimmende Gene, deren Transkription in den Hippokampi von beiden Mausmutanten verändert war. Plp, Ttr und Rab6 sind dabei in die gleiche und Faim2 und Aldoc3 in die entgegengesetzte Richtung reguliert. Außerdem waren 6 Gentranskripte, deren Expression in der Amygdala der konditionalen Mausmutante reguliert waren, auch im Hippokampus der konventionellen CRH-R1$^{-/-}$ Knockout-Mäuse unterschiedlich exprimiert. Außer bei Mbp ist die Richtung der Regulation entgegengesetzt. Dass einige der Kandidatengene entgegengesetzt reguliert sind, kann durch die spezifische Funktion des CRH-R1 in den einzelnen Regionen bedingt sein. Zwischen dem Hippokampus und der Hypophyse des CRH-R1$^{-/-}$ Knockouts gibt es nur eine Übereinstimmung.
Insgesamt betrachtet gibt es daher nur geringe Übereinstimmungen der Expressionsprofile.

	Konditionaler CRH-R1 Knockout			**Konventioneller CRH-R1$^{-/-}$ Knockout**	
	Hippo-kampus	**Amygdala**	**Hypo-thalamus**	**Hippo-kampus**	**Hypo-physe**
Hemoglobin, beta adult major chain (Hbb-b1)	-1.62	-1.29	1.29		
Oxidation resistance 1 (Oxr1)	-1.45	-1.56	-1.53		
Guanine nucleotide binding protein, beta 4 (Gnb4)	1.41	1.09			
Sortilin-related receptor (Sorl1)	1.43	1.58			
RIKEN cDNA 9630019K15 gene	-1.93	-1.46			
Proteolipid protein (myelin) (Plp)	1.53	-1.31		1.42	
AI835922	1.30	-1.30			
AI838219	1.23	-1.38			
cDNA sequence BC036961		-1.13	1.27		
Dihydropyrimidinase-like 2 (Dpysl2)		1.11	-1.13	-1.23	
Guanine nucleotide binding protein, alpha o (Gnao1)		-1.40	1.35		
Melanoma antigen, family H, 1 (Mageh1)		-1.26	1.35		
Solute carrier family 34, member 1 (Slc34a1)		1.33	-1.15		
Succinate-Coenzyme A ligase, beta subunit (Sucla2)		1.17	1.35		
Basic leucine zipper and W2 domains 1 (Bzw1)	-1.49		-1.48		
RAB6, member RAS oncogene family (Rab6)	-3.21		-2.56	-1.60	
Phosphoglucomutase 2-like 1 (Pgm2l1)	-1.25		-1.56		
Transthyretin (Ttr)	-1.45		2.43	-1.66	
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (Enpp2)	-1.29			-1.26	
Zinc finger protein, multitype 2 (Zfpm2)	-1.67				-1.35

	Konditionaler CRH-R1 Knockout			Konventioneller CRH-R1$^{-/-}$ Knockout	
	Hippo-kampus	Amygdala	Hypo-thalamus	Hippo-kampus	Hypo-physe
Aldolase 3, C isoform (Aldoc)	-1.71			1.21	
Fas apoptotic inhibitory molecule 2 (Faim2)		1.26		1.36	
Myelin basic protein (Mbp)		1.10		1.25	
RAD21 homolog (S. pombe) (Rad21)		-1.57		1.51	
RIKEN cDNA 0610012G03 gene		1.16		-1.12	
RIKEN cDNA 9830141H23 gene		-1.48		1.64	
Islet cell autoantigen 1 (Ica1)				1.59	1.22

Tabelle 4.1-3: Vergleich der Genexpressionsprofile.
Es wurden die Genexpressionsprofile der verschiedenen Hirnregionen miteinander verglichen. Aufgelistet sind die Gene und deren Regulationslevel, die in mindestens zwei Regionen übereinstimmend signifikant differentiell exprimiert wurden.

4.1.3 Funktionelle Kategorisierung der differentiell regulierten Gene

Um die insgesamt 564 Gene, die in den verschiedenen Hirnregionen bzw. der Hypophyse der Mausmutanten signifikant differentiell exprimiert waren, in einen funktionellen Kontext zu setzen, wurden diese nach den Informationen des Gene-Ontology-Konsortiums klassifiziert (Ashburner et al., 2000). Dabei wurden die 546 Kandidaten 12 Funktionsklassen zugeordnet, die vorwiegend biologische Prozesse beschreiben (Abbildung 4.1-2). 226 Gene, darunter 170 ESTs, konnten entweder keiner dieser Kategorien zugeteilt werden oder die Funktion ist unbekannt. Einzelne Kandidaten können dabei mehr als einer Kategorie angehören.

Die Kategorien können wiederum unterteilt werden. So sind in der Kategorie Metabolismus eine Vielzahl von komplexen biologischen Prozessen, wie Proteinbiosynthese, Lipidstoffwechsel und Glykolyse zusammengefasst. Die Kategorie Transport beinhaltet Prozesse, wie Ionen- und Proteintransport. Proteine, die bei der Morphogenese, Myelinisierung, Zelladhäsion und der Cytoskelettstruktur eine Rolle spielen, wurden in die Kategorie zelluläre Organisation einsortiert. Zelldifferenzierung und Zellzyklus wurden unter Zellwachstum zusammengefasst. Zur vereinfachten Darstellung wurden die einzelnen Genfunktionen hier eher grob kategorisiert. Gene, die den Kategorien Metabolismus, Transkription/Translation und Transport zugehören, waren hier mit 17-20 % insgesamt am stärksten repräsentiert. Erwartungsgemäß wurde auch die Transkription von Genen, die in Signaltransduktionsprozesse involviert sind, deutlich verändert (9 %). Unter den regulierten Gentranskripten befinden sich außerdem Kandidaten, die die Zellorganisation (7 %) und das Zellwachstum (6 %) beeinflussen. Auffällig viele Gene (6 %) besitzen außerdem

Calciumionen-bindende Eigenschaften. Deutlich weniger Kandidaten können den Kategorien Entwicklung (5 %) und Immunsystem (3 %) zugeordnet werden. Die Abwesenheit des CRH-Rezeptors 1 verändert außerdem die Expression von wenigen Genen, die in synaptische Funktionen (3 %), Apoptose (3 %) und Endocytose/Exocytose (2 %) involviert sind.

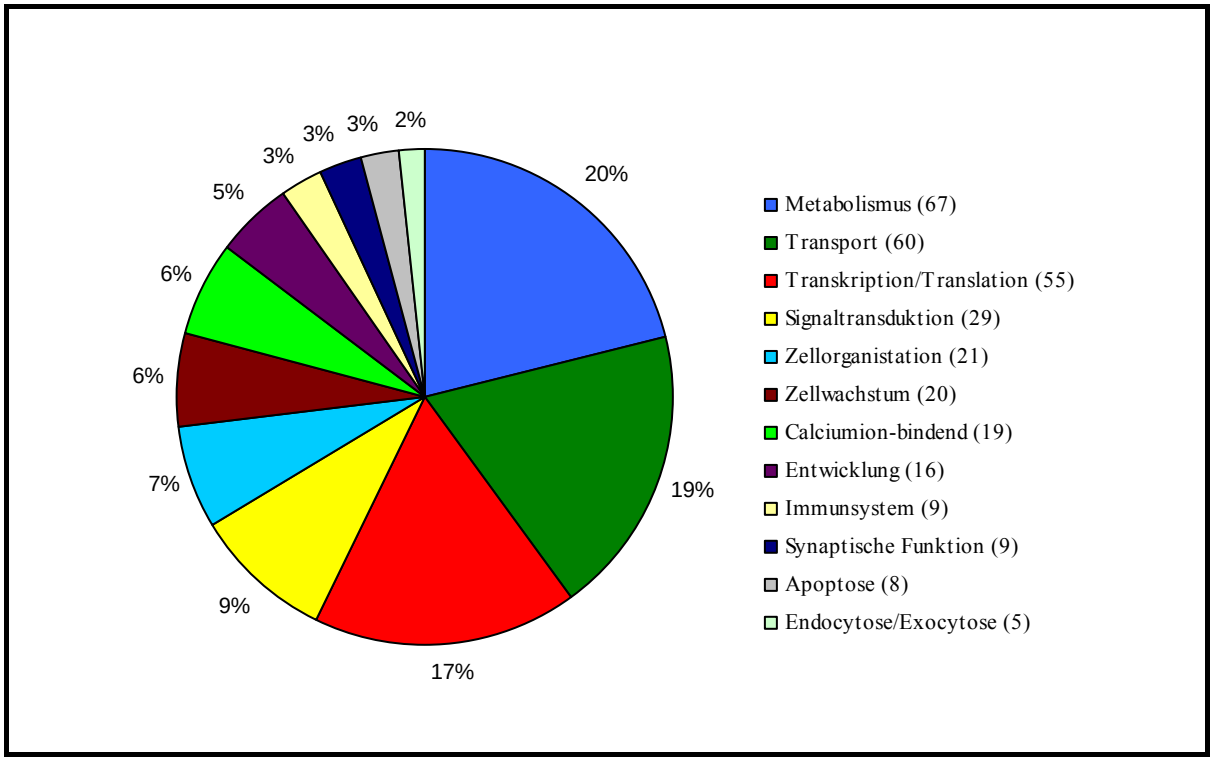


Abbildung 4.1-2: Übersicht der Funktionsklassen.
Dargestellt ist eine Übersicht der 12 Funktionsklassen (in %), denen die gesamten 549 signifikant regulierten Kandidatengene der *Microarray*-Analyse zugeordnet wurden. Die Gene wurden aufgrund der Information des *Gene-Ontology*-Konsortiums klassifiziert. Die Zahl in Klammern gibt die genaue Zahl der Gene an, die dieser Klasse angehören

Vergleicht man die Repräsentation der einzelnen Kategorien, so muß beachtet werden, dass schon grundsätzlich einzelne Klassen deutlich überpräsentiert sind. So sind nach Angaben des *Gene-Ontology*-Konsortiums zum Beispiel 5436 Gene in zelluläre Metabolismen (*Gene-Ontology*-Kategorie GO:0044237) und im Gegensatz dazu nur 384 Gene in Apoptose (GO: 006915) involviert.

Vergleicht man die Hirnregionen der Mausmutanten miteinander, so ergibt sich eine ähnliche Verteilung der Funktionsklassen (Tabelle 4.1-4). Die drei Funktionskategorien Metabolismus, Transkription/Translation und Transport sind in allen Hirnregionen etwa gleich stark vertreten. Auffällig ist, dass in den Hippokampi der zwei Mauslinien im Vergleich zu den anderen Regionen mehr als 10 % der Gene der Kategorie Entwicklung angehören. Erwartungsgemäß repräsentieren die regulierten Gene der Amygdala die meisten

Funktionsklassen, da in dieser Region auch mit Abstand die meisten unterschiedlich exprimierten Gene identifiziert wurden.

	CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre			CRH-R1$^{-/-}$	
Funktionskategorie	**Amyg-Dala**	**Hippo-kampus**	**Hypo-thalamus**	**Hippo-kampus**	**Hypo-physe**
Metabolismus					
Transkription/Translation					
Transport					
Zellwachstum					
Signaltransduktion					
Zellorganisation					
Calciumion-bindend					
Entwicklung					
Immunsystem					
Synaptische Funktion					
Apoptose					
Endocytose/Exocytose					

Tabelle 4.1-4: Klassifizierung der Kandidatengene.
Dargestellt ist eine Übersicht über die Anzahl der Kandidatengene der verschiedenen Hirnregionen und Mausmutanten, die in die Funktionsklassen eingeteilt wurden.

> 20 %
> 15 %
> 10 %
> 5 %
< 5 %

4.1.4 Verifizierung der *Microarray*-Daten mittels quantitativer *real-time* PCR (qRT-PCR)

Aus der Liste der statistisch signifikant regulierten Gene wurden Kandidaten ausgewählt, deren Expressionveränderung mit einer unabhängigen Methode validiert werden sollte. Diese Gene wurden aufgrund ihres relativ hohen Expressionsunterschieds (>2.5-fach) und der Signifikanz ausgewählt. Ein weiteres Kriterium war die funktionelle Relevanz dieser Gene, die nach Literaturrecherche auf eine mögliche Involvierung in CRH-abhängige oder allgemein Stress-aktivierte Signaltransduktionwege hindeutet.

Zunächst wurden die Sequenzen dieser *Microarray*-Klone verifiziert, da 10-20 % der Klone falsch annotiert sind. Die Tabellen 4.1-5 A–E zeigen eine Übersicht der ausgewählten *Microarray*-Klone mit gegebenenfalls korrigierter Annotation. Einige Kandidatengene (z.B. Rab6, Ttr, Ptgds, Oxr1) sind durch zwei oder mehr Klone auf einem *Array* vertreten, was zeigt, dass der Expressionsunterschied nicht aufgrund der Spotlokalisation auf dem *Microarray* detektiert wurde. Um die differentielle Genexpression dieser Gene zu validieren, wurde die quantitative *real-time* PCR angewendet. Gene, deren Expression mit dieser

Methode untersucht wurden, sind in den Tabellen 4-5 A-E grau unterlegt. Bei den anderen Transkripten konnten entweder kein geeignetes Primerpaar für die Amplifizierung konstruiert werden oder die Amplifikationeffizienz der Sequenz war für die Auswertung nicht ausreichend (Pld1, Mtap1b, D19Ertd368e, RIKEN Klon 2610016E04, RIKEN Klon 1700001E04, RIKEN Klon E430024L04). Einige Kandidaten waren zu schwach exprimiert, um mit der qRT-PCR nachgewiesen zu werden (Daf1, Clqtnf5, Nmu, Ica1, RIKEN Klon 181000A14, Prkcbp1).

Tabelle 4.1-5 A: Differentiell exprimierte Gene im **Hippokampus** von konventionellen CRH-R1$^{-/-}$ Knockout-Mäusen

Spot	ID	Genname	Gensymbol	E*	Statistik	
					P-Wert	A2
1480	**AI847846**	**Transthyretin**	Ttr	-1,58	0,01	t
3353	**NM_008963**	**Prostaglandin D2 Synthase**	Ptgds	-1,49	0,02	t
3515	AI83735	Transmembrane 4 sf 11	Tm4sf11	1,44	0,07	t
4186	AI839996	Rap2 interacting protein	Rap2ip	-1,49	0,15	t
4986	AI842958	FYVE and coiled-coil domain containing 1	Fyco1	2,30	0,05	t
5990	AK036613	9830141H23Rik	9830141H23Rik	1,64	0,15	t
6292	**AI852932**	**Rab6, member ras oncogene family**	Rab6	-1,93	0,02	t
7820	AI843407	Islet cell autoantigen 1	Ica1	1,59	0,05	t
14205	NM_026047	2610206B13Rik	MGC58343	-1,77	0,00	t
15359	**AI841151**	**Proteolipid protein**	Plp	1,42	0,15	t
16219	**AI841101**	**Aldolase 3, C isoform**	Aldoc	-1,71	0,22	t
22080	AI843553	Heat shock 70kDa protein 5	Hspa5	-1,46	0,02	t
24097	AI847432	DEAD box polypeptid 28	Ddx28	-1,58	0,16	t

Tabelle 4.1-5 B: Differentiell exprimierte Gene in der **Hypophyse** von konventionellen CRH-R1$^{-/-}$ Knockout-Mäusen

Spot	ID	Genname	Gensymbol	E*	Statistik	
					P-Wert	A2
665	AI385536	Cadherin 2	Cdh2	1,26	0,04	f
666	AI326787	Lipoprotein lipase	Lpl	1,50	0,03	t
2371	AI428433	Erbb2 interacting protein	Erbb2ip	1,27	0,05	f
7627	AI839615	K^+ voltage-gated channel, Shal-related family, 2	Kcnd2	1,41	0,05	f
8647	AI834826	Tetratricopeptide repeat domain 3	Ttc3	1,71	0,09	t
9256	AI843660	Ectodermal-neural cortex 1	Enc1	1,69	0,10	t
9724	AI847765	Regulator of G-protein signaling 4	Rgs4	1,47	0,09	t
10232	AI834874	Glioblastoma amplified sequence	Gbas	-1,53	0,09	t
10686	AI847452	Solute carrier family 17, member 6	Slc17a6	1,61	0,02	t
12514	AI844249	Guanine nucleotide binding protein, γ2 subunit	Gng2	-1,33	0,03	f
14036	AI852492	p21 (CDKN1A)-activated kinase 3	Pak3	1,35	0,04	f
14296	AI852254	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2	Nmnat2	-1,59	0,02	t
14946	AI852848	Alpha-2-macroglobulin	A2m	-1,75	0,03	t
15846	AI853451	Protein kinase, cAMP dependent, catalytic, α	Prkaca	-1,27	0,03	f

Tabelle 4.1-5 C: Differentiell exprimierte Gene im **Hippokampus** von konditionalen CRH-R1 Knockout-Mäusen

Spot	ID	Genname	Gensymbol	E*	Statistik	
					P-Wert	A2
1480	AI847846	**Transthyretin**	**Ttr**	1,45	0,07	t
2049	AB093274	Unigene cluster cpeb3		-1,77	0,00	t
3370	NM_008220	Hemoglobin, beta adult major chain	Hbb-b1	-1,62	0,00	t
4080	AI840074	E430034L04Rik	E430034L04Rik	1,69	0,21	t
5167	AI413651	Calsyntenin 3	Clstn3	-1,65	0,01	t
6532	NM_011653	Tubulin, alpha 1	Tuba	-1,67	0,07	t
8675	AI429183	1700001E04Rik	1700001E04Rik	-1,67	0,16	t
11540	AI848270	Sortilin-related receptor	Sorl1	1,43	0,03	t
11601	NM_007502	ATPase, beta 3 polypeptide	Atp1b3	-1,71	0,03	t
12481	AI841902	D19Ertd386e	D19Ertd386e	1,65	0,07	t
13930	AI839351	9630019K15Rik	9630019K15Rik	-1,93	0,25	t
13981	AI839351	2610016F04Rik	2610016F04Rik	1,93	0,08	t
15359	AI841151	Proteolipid protein	Plp	1,53	0,11	t
17426	AA184105	Decay accelerating factor 1	Daf1	1,79	0,21	t
18215	AI843451	Eukaryotic translation elongation factor alpha 1	Eef1a1	2,07	0,01	t
19080	**AI850036**	**Oxidation resistance 1**	Oxr1	-1,69	0,04	t
20606	AI451698	2810468K05Rik	2810468K05Rik	1,56	0,25	t
20907	AI850277	Neuromedin U	Nmu	-1,87	0,17	t
23617	NM_026047	Rab6, member ras oncogene family	Rab6	-1,99	0,20	t

Tabelle 4.1-5 D: Differentiell exprimierte Gene in der **Amygdala** von konditionalen CRH-R1 Knockout-Mäusen

Spot	ID	Genname	Gensymbol	E*	Statistik	
					P-Wert	A2
56	AI854896	Neuronal pentraxin 1	Nptx1	-1,72	0,04	t
618	AI846500	Polymerase (RNA) III polypeptide K	Polr3k	-1,70	0,07	t
833	AI853881	RIKEN cDNA 0610010K06 gene	0610010K06Rik	1,74	0,05	f
1245	AI836813	Hypothetical protein C230026C11	C230026C11	1,75	0,02	t
3185	AI853444	2610042L04Rik	2610042L04Rik	-1,61	0,00	t
3996	BC020382	NADH dehydrogenase	mtNd4	-1,59	0,00	t
5760	AB836867	mRNA for KIAA0417		1,56	0,02	t
7583	AI426478	Phospholipase D1	Pld1	1,55	0,08	t
8932	**AI841851**	**heat shock protein 1, alpha**	Hspca	1,65	0,04	t
9007	NM_026637	A030007L17Rik	5730551F12Rik	1,61	0,04	t
9359	NM_025457	1810008A14Rik	4933405A16Rik	1,70	0,03	t
11540	AI848270	Sortilin-related receptor	Sorl1	1,58	0,07	t
12188	AI845829	Asialoglycoprotein receptor 1	Asgr1	-1,63	0,06	t
12480	AI836697	RIKEN cDNA 2310008M10 gene	2310008M10Rik	1,59	0,08	t
13218	AI843815	D19Ertd144e	D19Ertd144e	-1,65	0,07	t
14119	AI840794	Surfeit gene 5	Surf5	1,86	0,01	t
14439	AI850020	Hemochromatosis	Hfe	-1,67	0,00	t
14586	**AI844948**	**GZ5 tRNA-Glu gene**	**GZ5 tRNA-Glu**	-1,74	0,00	t
15111	AI844703	F-box only protein 23	Fbxo23	-1,60	0,00	t
15972	NM_022031	Hyaluronan and proteoglycan linked protein 2	Hplnp2	-1,60	0,00	f
18464	AI666784	Protein kinase C binding protein 1	Prkcbp1	1,48	0,03	t

Spot	ID	Genname	Gensymbol	E*	Statistik	
					P-Wert	A2
19080	**AI850036**	**Oxidation resistance 1**	Oxr1	-1,74	0,00	t
19330	AI848068	Microtubule-associated protein 1 B	Mtap1b	1,80	0,07	t
19891	AI449281	Septin 2	Sept2	2,35	0,08	t
21380	AI426148	RIKEN cDNA 4933424F08 gene	4933424F08Rik	1,66	0,05	t
22335	AI850603	RIKEN cDNA 2810457I06 gene	2810457I06Rik	1,77	0,02	f
22772	AI843605	RIKEN cDNA 0610010E21 gene	0610010E21Rik	-1,68	0,00	f
23115	AK088432	RIKEN cDNA E430016I18 gene	E430016I18 Rik	-1,81	0,00	f

Tabelle 4.1-5 E: Differentiell exprimierte Gene im **Hypothalamus** von konditionalen CRH-R1 Knockout-Mäusen

Spot	ID	Genname	Gensymbol	E*	Statistik	
					P-Wert	A2
821	AI425976	RIKEN cDNA E030034P13 gene	E030034P13Rik	-1,50	0,19	t
1435	AI841889	Procollagen, type XI, alpha 1	Col11a1	1,59	0,16	t
1480	**AI847846**	**Transthyretin**	Ttr	2,43	0,02	t
4608	**NM_027629**	**Phosphoglucomutase 2-like 1**	Pgm2l1	-1,56	0,02	t
5667	AK036010	RIKEN cDNA 9630026O22 gene	9630026O22Rik	-1,70	0,24	t
10294	NM_009982	Cathepsin C	CtsC	1,88	0,25	t
10499	AA967759	RIKEN cDNA A930031F18 gene	A930031F18Rik	1,73	0,12	t
12476	**AI413721**	**Rab6, member ras oncogene family**	Rab6	-2,68	0,02	t
14177	AI427891	Rhesus blood group-associated C glycoprotein	Rhcg	1,70	0,20	t
16491	AI835942	Trafficking protein particle complex 3	Trappc3	-1,53	0,22	t
19080	**AI850036**	**Oxidation resistance 1**	Oxr1	-1,64	0,02	t
19551	NM_053007	Ciliary neurotrophic factor	Cntf	-1,56	0,18	t
20455	AI327297	TATA box binding protein	Tbp	1,55	0,20	t

Tabelle 4.1-5 A-E: Übersicht differentiell exprimierter Gene in CRH-R1 Mausmutanten in verschiedenen Regionen.
Die Spotnummer und ID ordnen der jeweiligen Sequenz den *Microarray*-Klon bzw. die *Accession*-Nummer in der NCBI Datenbank zu. E* ist der Expressionsunterschied des Gens zwischen der Mausmutante und dem Wildtyp. Die Statistik beschreibt den p-Wert und *accept2* (A2) sagt aus, ob der Regulationsunterschied wahr ("t", true) oder falsch ("f", false) (siehe Methoden). Fettgedruckte Gene sind mit zwei oder mehr regulierten Klonen auf dem *Microarray* vertreten. Grau unterlegte Gene wurden mit qRT-PCR analysiert.

Die cDNA für die qRT-PCR wurde aus einem RNA-Pool hergestellt und in drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten mit genspezifischen Primern ampilifiziert. Die Expressionstärke des Gens wurde mit dem Haushaltsgen Hprt normalisiert und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode quantifiziert (siehe Methoden). Da für jedes Gen Intron-übergreifende Primer gewählt wurden und jede Reaktion mit einer minus-RT-Kontrolle (cDNA Synthese ohne reverse Transkriptase) und Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wurde, konnten DNA-Kontaminationen und unspezifische Amplifikation ausgeschlossen werden (Abbildung 4.1-3 und 4.1-4).

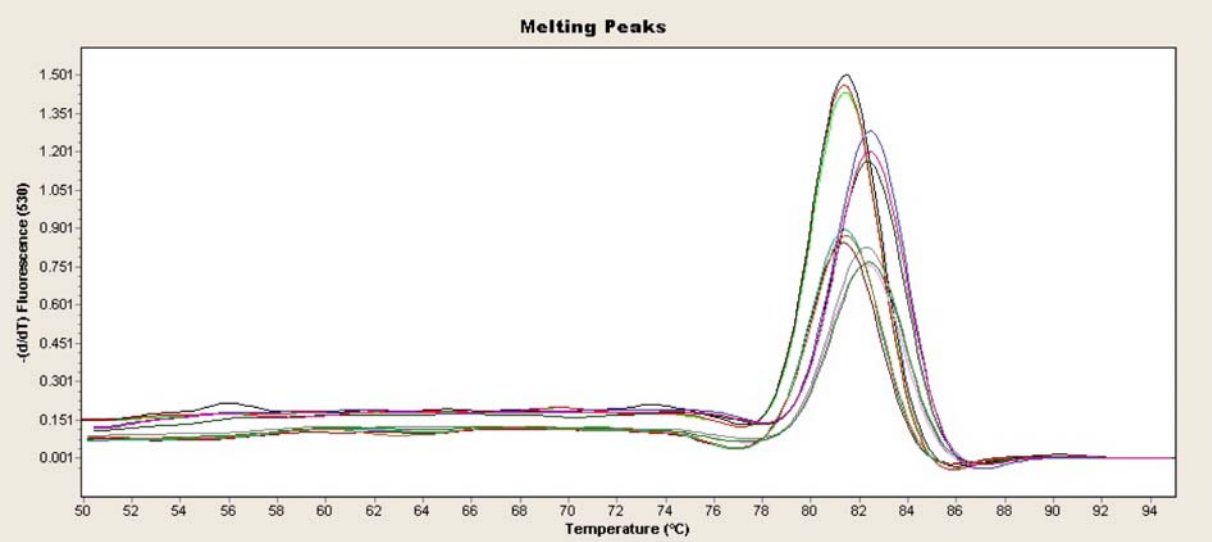


Abbildung 4.1-3 Repräsentative Schmelzkurvenanalyse einer *real-time* PCR-Reaktion.
Dargestellt sind die Schmelzkurven der PCR-Reaktionen (Triplikate) des untersuchten Gens (Oxr1) und Hprt von CRH-R1 Wildtyp-Mäusen und konditionalen CRH-R1 Mausmutanten. Die x-Achse repräsentiert die Temperatur und die y-Achse stellt die Ableitung des Fluoreszenzsignals bei 530 nm dar. Es kann hier gezeigt werden, dass bei jeder PCR-Reaktion ein spezifisches PCR-Produkt mit einem definierten Schmelzpunkt entsteht

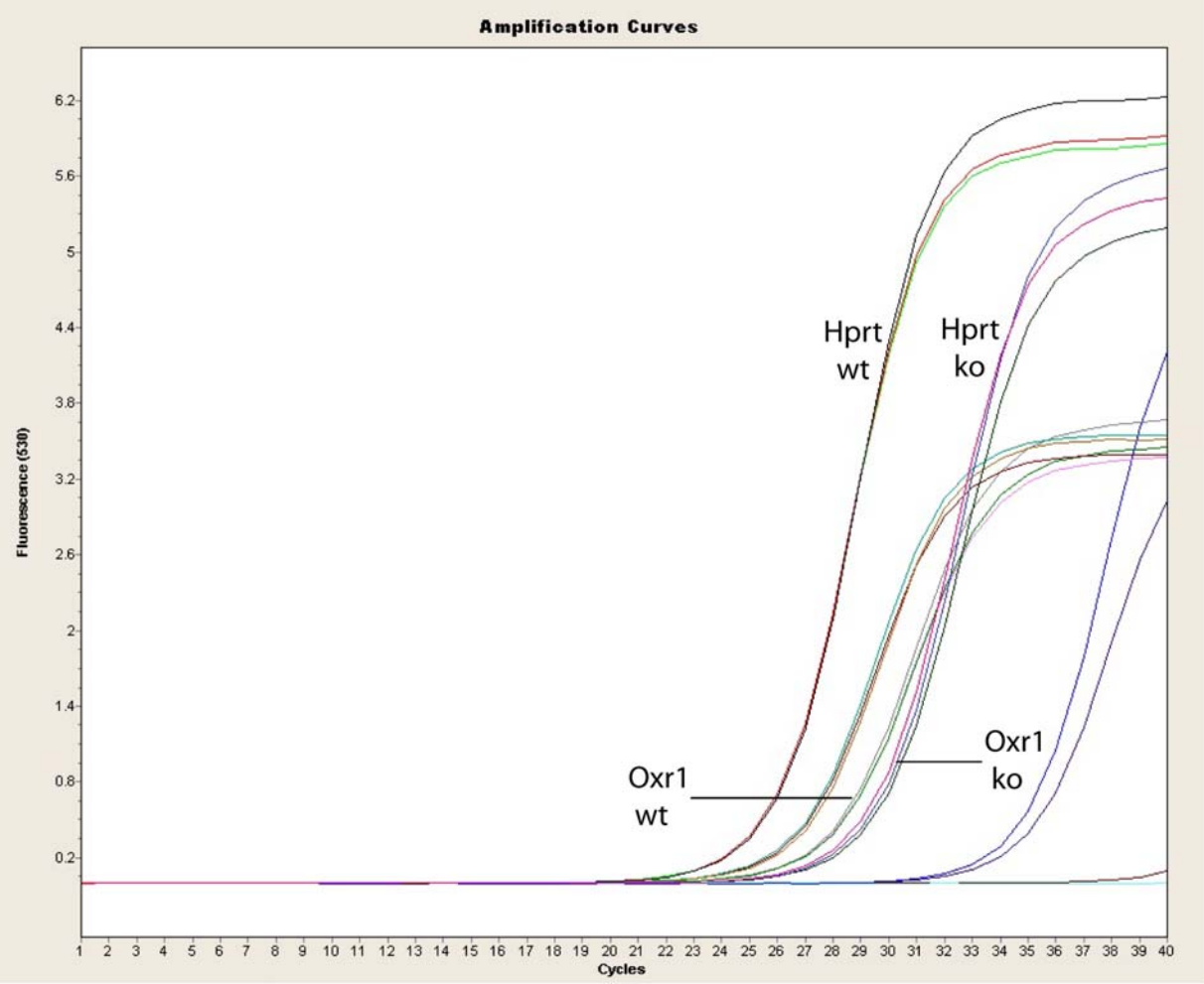


Abbildung 4.1-4: Repräsentative Darstellung der Amplifikationskurven einer quantitativen *real-time* PCR-Reaktion. Das Fluoreszenzsignal repräsentiert die Zunahme der Kopien des PCR-Produkts von Oxr1 und Hprt bei Wildtyp (wt)- und Knockout (ko)-Mäusen. Die x-Achse stellt die Zahl der PCR-Zyklen dar und die y-Achse das Fluoreszenzsignal bei 530 nm. Der *threshold cycle* (C_T)- Wert dieser Reaktionen wurde mit der "second derivative maximum"-Methode der Lightcycler-Software bestimmt. Wie beschrieben wurde der Expressionsunterschied mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$-Methode relativ quantifiziert.

Es wurden insgesamt 33 Gene untersucht. Bei 17 Kandidaten (~ 50 %) konnten die Ergebnisse aus dem *Microarray*-Experiment erfolgreich bestätigt werden. Im Hippokampus der CRH-R1$^{-/-}$ Knockout-Mäuse konnte die heraufregulierte Expression von Fyco1 (3,38), Plp (1,28) und Tm4sf11 (1,56) und die Herabregulierung von Aldoc3 (-1,87), Ptgds (-2,24), Rap2ip (-1,26) und Ttr (-2,16) mit Hilfe der qRT-PCR gezeigt werden, womit die Ergebnissen des *Microarrays* unabhängig verifiziert wurden (Abbildung 4.1-5 A).

Die veränderte Expression von Rab6 konnte nicht bestätigt werden. In der Hypophyse wurde die differentielle Expression von 2 der 8 untersuchten Gene, Rgs4 (2,65) und Nmnt4 (-1,25), validiert (Abbildung 4.1-5 B). Die Transkripte Cdh2, Gng2, Pak3 und Prkaca waren laut der *Microarray*-Analyse weniger als 1.4-fach reguliert. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich zu gering, um mit der qRT-PCR nachgewiesen zu werden, da dies einem Unterschied im *threshold cycle* von 0.46 PCR-Zyklen entspricht und dieser Wert sehr nah an den Schwankungen einer qRT-PCR-Reaktion liegt. Bei den konditionalen CRH-R1 Knockout-Mäusen wurden nur die Kandidatengene aus dem Hippokampus und der Amygdala untersucht, da die gesamte Hypothalamus-RNA für das *Microarray*-Experiment benötigt wurde. Der Expressionunterschied von Oxr1 (-1,84 bzw. -1,77) konnte hier sowohl im Hippokampus als auch in der Amygdala der Knockout-Mäuse bestätigt werden. Das Ergebnis für Sorl1 ist nur in der Amygdala (1,23) nicht aber im Hippokampus signifikant (1,29). Desweiteren wurde übereinstimmend mit den *Microarray*-Daten die Herabregulierung von Clstn3 (-1,32), Cpeb3 (-1,3) und Ttr (-1,41) im Hippokampus und dem RIKEN Klon 2610042L04 (-2,1) in der Amygdala gezeigt (Abbildung 4.1-5 D und E). Die Expression dieses RIKEN Klons wurde anschließend auch im Hippokampus der Knockout-Mäuse analysiert, da dieser entsprechend der *Microarray*-Daten eine schwächere Expression (-1,31) zeigte, die jedoch statistisch nicht signifikant war (p-Wert: 0,18). Mit der qRT-PCR konnte ein 1,84-facher Expressionsunterschied nachgewiesen werden (Abbildung 4.1-5 D). Die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse korrelieren außer bei 3 Kandidaten (Rgs4, Ptgds, Fyco1) gut mit den Expressionsunterschieden, die mit der qRT-PCR bestimmt werden konnten (+/- 0,5).

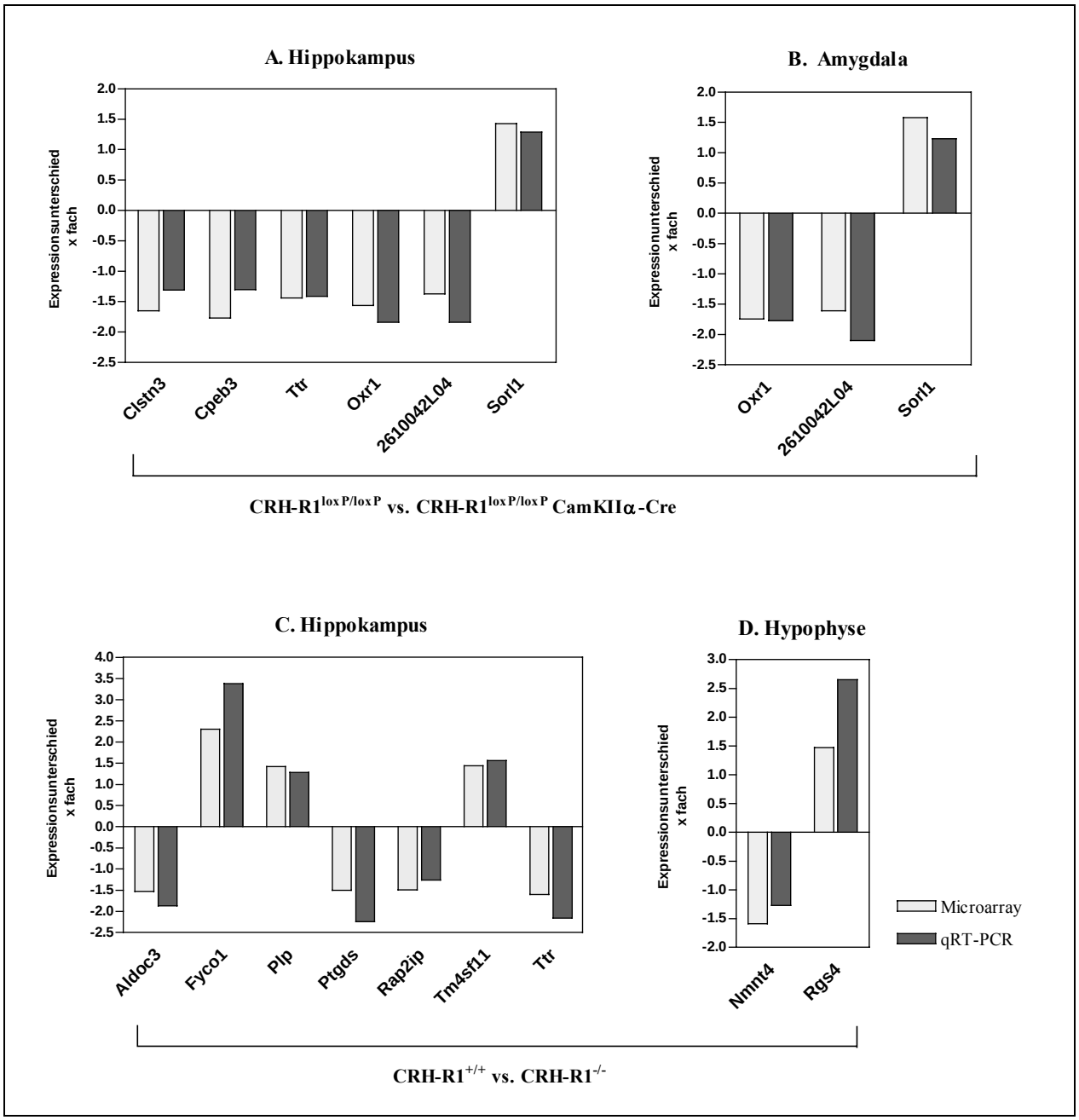


Abbildung 4.1-5 A-D: qRT-PCR Verifizierung der *Microarray*-Daten.
Die x-Achse repräsentiert die validierten Gene (Gensymbole siehe Tabelle 4.1-5). Die y-Achse zeigt den Expressionsunterschied von Genen in Hippokampus und Amygdala der CRH-R1$^{loxP/loxP}$CaMKIIα-Cre Mauslinie (A und B) und im Hippokampus und der Hypophyse von konventionellen CRH-R1$^{-/-}$ Knockout-Mäusen (C und D) verglichen mit Wildtyp-Mäusen. Die hellgrauen Balken zeigen den Expressionsunterschied der Gene aus der *Microarray*-Analyse. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren den Regulationsunterschied, der mit der qRT-PCR ermittelt wurde. Die relative Quantifizierung der mRNA wurde mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode durchgeführt (beschrieben in Methoden) (3 unabhängige Experimente mit je 3 Replikaten). Die qRT-PCR Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test und t-Test getestet, alle Daten bis auf sorl1 im Hippokampus (0,057) sind statistisch signifikant ($P < 0.05$; siehe Anhang 6.2).

Außerdem haben wir die Expression von 5 verifizierten Kandidatengenen (Plp, Ptgds, Rap2ip, Fyco1, Aldoc3), die im Hippocampus der konventionellen CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutante reguliert waren, im Hippokampus der konditionalen CRH-R1 Knockout-Mäuse mittels qRT-PCR

untersucht. Umgekehrt wurde die Expression von 3 Kandidatengenen (Cpeb3, Clstn3, RIKEN Klon 2610042L04), die im Hippokampus der konditionalen CRH-R1-Mausmutanten validiert werden konnten, im Hippokampus der CRH-R1$^{-/-}$ Knockout-Mäuse analysiert. Damit sollte überprüft werden, ob die *Microarray*-Analyse die differentielle Expression dieser Gene möglicherweise aus technischen Gründen nicht detektiert hat bzw. nicht als statistisch signifikant erachtet hat. Mit der qRT-PCR konnte jedoch kein Expressionsunterschied bei Kandidatengenen gezeigt werden, wenn nicht bereits die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse einen Unterschied ergeben haben (Tabelle 4.1-6).

	CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre	**CRH-R1$^{-/-}$**
Cpeb3	-1,05	-1,30
Clstn	-1,05	-1,32
Plp	1,28	-1,16
Ptgds	-2,24	-1,01
Rap2ip	-1,26	1,09
Fyco1	3,38	-1,06
Aldoc	-1,87	-1,10
RIKEN Klon 2610042L04	1,16	-1,84

Tabelle 4.1-6: qRT-PCR Analyse verifizierter Gene im Hippokampus.
Gene, die mit der *Microarray*-Analyse identifiziert und mit der qRT-PCR validiert wurden, sind grau unterlegt. Diese Gene wurden im Hippokampus der anderen Mauslinie untersucht.

4.1.5 Weiterführende Expressionsanalyse ausgewählter Kandidatengene

4.1.5.1 *In Situ* Expressionsanalyse von Rap2ip und Fyco1

Das Expressionsmuster der Kandidatengene Rap2ip und Fyco1 wurde bisher nicht mit *in situ* Hybridisierungen untersucht. Da die differentielle Expression dieser Gene verifiziert werden konnte und diese Gene hinsichtlich ihrer Funktion interessant erscheinen, wurde die Expression dieser Gene mittels *in situ* Hybridisierung im Hippokampus der konventionellen CRH-R1-Mauslinie untersucht. Für den direkten Vergleich wurden Hirnschnitte der Wildtyp-Mäuse und der Knockout-Mäuse auf einem Objektträger nebeneinander aufgezogen und hybridisiert (Abbildung 4.1-6).

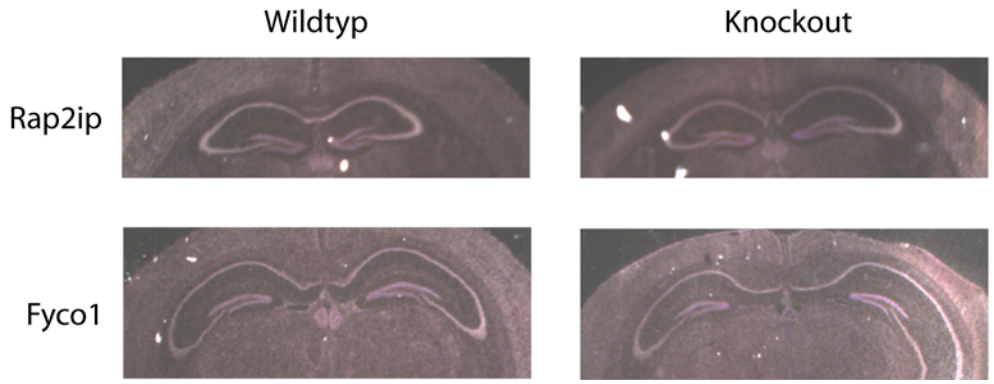


Abbildung 4.1-6: *In situ* Expressionsanalyse von Rap2ip und Fyco1 im Hippocampus der CRH-R1$^{+/+}$ (Wildtyp) und CRH-R1$^{-/-}$ (Knockout) Mauslinie.
Dargestellt ist ein repräsentativer Ausschnitt des Hippokampus einer CRH-R1 Wildtyp- und einer Knockout-Maus.

Als Hybridisierungssonde wurde die T3 amplifizierte Sequenz des *Microarray*-Klons verwendet. Zur Kontrolle wurde eine *sense*-Probe hergestellt und hybridisiert (Daten nicht gezeigt). Es konnten hier für beide Gene ein spezifisches Signal in der Pyramidalzellschicht des Hippokampus und im Gyrus Dentatus festgestellt werden. Die Expressionsunterschiede, die mit der *Microarray*-Analyse und der qRT-PCR ermittelt wurden, konnten hier allerdings nicht gezeigt werden. Da es sich bei der Pyramidalzellschicht des Hippokampus um eine sehr dichte Zellschicht handelt, können diese Expressionsunterschiede mit dieser Technik wahrscheinlich nicht detektiert werden. Möglicherweise ist die Methode der *in situ* Hybridisierung nicht sensitiv genug, um relativ geringe Expressionsunterschiede nachzuweisen und würde sich hier nur eignen, um bisher nicht bekannte Expressionsmuster zu analysieren. Eine erfolgreiche Anwendung in der Verifizierung der *Microarray*-Daten wird oft bei Genen mit höheren Expressionsunterschieden gezeigt (Reyes et al., 2003; Datson et al., 2004).

4.1.5.2 Expressionsanalyse von Rab6 mittels *Northern Blot*

Das Gen Rab6 ist einer der Kandidaten, dessen Transkription in drei Regionen (Hippokampus und Hypothalamus des konditionalen und Hippokampus der konventionellen CRH-R1 Knockout-Mauslinie) laut *Microarray*-Analyse deutlich herabreguliert war. Rab6 ist in intrazelluläre Transportprozesse involviert und wird PKC-abhängig aktiviert (White et al., 1999; Fitzgerald und Reed, 1999; Scheper et al., 2004). Aufgrund der *Microarray*-Daten und seiner Funktion ist Rab6 bezogen auf CRH-abhängige Signalmechanismen ein interessanter Kandidat.

Eine Verifizierung der Transkriptionsveränderung mit quantitativer RT-PCR war jedoch trotz Verwendung unterschiedlicher Primerpaare nicht erfolgreich. Um zu überprüfen, ob dieses Gen möglicherweise bisher nicht bekannte Spleißvarianten besitzt, die die Ergebnisse der PCR verfälschen, wurde eine *Northern Blot* Analyse durchgeführt. Verwendet wurde ein Pool der Hippokampus-RNA von konventionellen und konditionalen CRH-R1 Mausmutanten. Als Sonde wurde ein mit den Primern T3/T7 aus den *Microarray*-Klonen amplifiziertes PCR-Produkt verwendet. Der *Northern Blot* zeigt ein RNA-Transkript in der erwartenden Größe von 3.4 Kb, andere Transkripte sind nicht erkennbar (Abbildung 4.1-7). Es konnte kein Unterschied in der Signalintensität festgestellt werden. Die Daten der *Microarray*-Analyse konnten hier mit zwei unabhängigen Methoden nicht validiert werden.

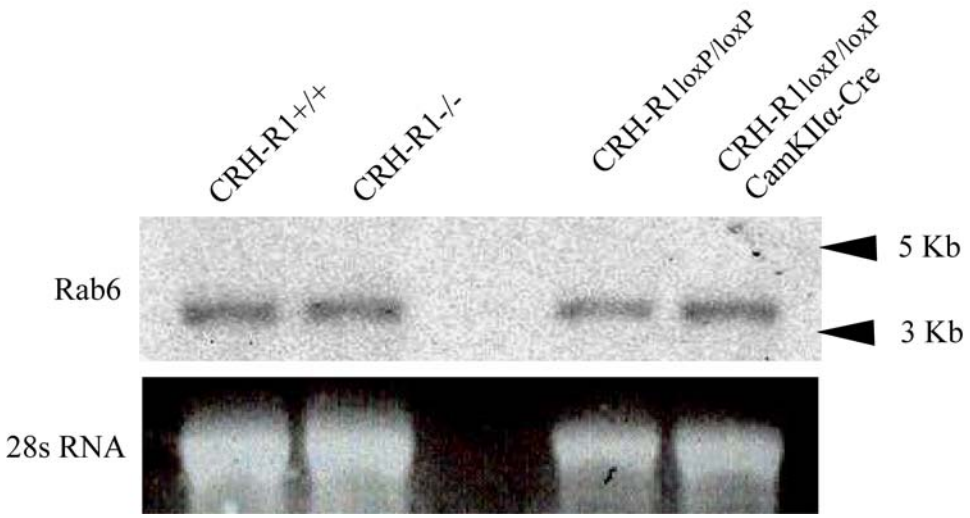


Abbildung 4.1-7: *Northern Blot* Analyse von Rab6.
Es wurden 8 µg RNA aus einem RNA-Pool von 6 Tieren je Genotyp aufgetragen. Verglichen wurden die CRH-Wildtyp-mit den Knockout-Mäusen der konventionellen (links) und der konditionalen Mausmutanten (rechts). Als Referenz ist 28s RNA gezeigt.

4.1.6 Expressionsanalyse ausgewählter Kandidatengene nach Stress-erfahrung

Wie gezeigt werden konnte, führt die Abwesenheit des CRH-Rezeptors 1 zu einer Veränderung der Genexpression in verschiedenen Hirnregionen. Es ist bekannt, dass Stress zu einer Aktivierung des CRH-Systems führt. Um der Frage nachzugehen, ob einzelne Kandidatengene aus der *Microarray*-Analyse in molekulare Mechanismen, die einer Stressreaktion zugrunde liegen, involviert sind, wurde mit den konditionalen Mausmutanten ein Stressexperiment durchgeführt. Die Expression dieser Kandidatengene nach

Stresserfahrung wurde in Wildtyp-Mäusen untersucht und mit der Expression in gestressten konditionalen CRH-R1 Knockout-Mäusen verglichen.

Wir haben hier Immobilisierungsstress (*restraint stress*) als Stressor gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass durch Immobilisierung von Versuchstieren psychologischer und physischer Stress ausgelöst wird, was zu verhaltensspezifischen und physiologischen Veränderungen führt (Michajlovskij et al., 1988; Pacak et al., 2001).

Die Mäuse wurden 10 min durch Immobilisierung gestresst und nach 6 Stunden getötet. Anschließend wurde die RNA von je 6 Tieren pro Gruppe aus Amygdala und Hippokampus isoliert und in cDNA umgeschrieben. Sechs Kandidaten aus der *Microarray*-Analyse (Fyco1, Rgs4, Oxr1, Clstn3, Cpeb3, RIKEN Klon 2610042L04) wurden ausgewählt, um deren Expression in gestressten konditionalen Knockout-Mäusen im Vergleich zu gestressten Wildtyp-Mäusen und nichtgetressten Wildtyp- und Knockout-Mäusen mit qRT-PCR zu untersuchen. Außer bei dem RIKEN Klon 2610042L04 wurde die Expression vorerst nur im Hippokampus und nicht in der Amygdala untersucht. Ein Unterschied in der Genexpression unter Stressbedingungen konnte nur bei dem RIKEN Klon 2610042L04 gezeigt werden (Abbildung 4.1-8).

Der Vergleich der Expression des RIKEN Klons im Hippokampus von nicht-gestressten Wildtyp-Mäusen mit gestressten Wildtyp-Mäusen zeigte, dass die Expression des Gens 1.66-fach herabreguliert wurde. Im Gegensatz dazu wurde die Expression des Transkripts bei gestressten Knockout-Mäusen im Vergleich zu nicht-gestressten Knockout-Mäusen kaum verändert (+ 1,07-fach, nicht signifikant). Der Vergleich gestresster Wildtyp-Mäuse mit gestressten Knockout-Mäusen zeigte hingegen eine verstärkte Expression des Gens (+ 1,39-fach, nicht signifikant). Die Analyse der Genexpression des RIKEN Klons 2610042L04 in der Amygdala ergab ähnliche Ergebnisse. In gestressten verglichen mit nicht gestressten Wildtyp-Mäusen wurde die Transkription um das 1.58-fache herabreguliert. Im Unterschied zum Hippokampus wurde hier jedoch in gestressten verglichen mit nicht-gestressten Knockout-Mäusen die Transkription deutlich erhöht (+ 2,07-fach).

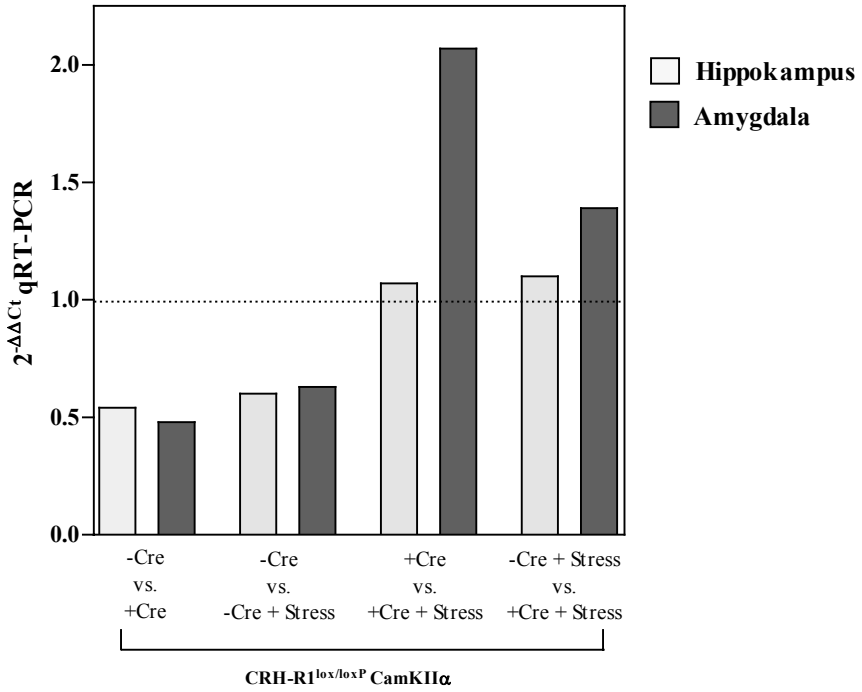


Abbildung 4.1-8: qRT-PCR Analyse der Genexpression des RIKEN Klons 2610042L04 nach Stresserfahrung.
Die Expression des RIKEN Klons wurde im Hippokampus und der Amygdala der CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre Mauslinie analysiert. Die y-Achse repräsentiert den $2^{-\Delta\Delta Ct}$ – Wert von 3 Replikaten aus 3 unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden nicht-gestresste Wildtyp-Mäuse (-Cre) mit gestressten Wildtyp-Mäusen (Balken 3 und 4), nichtgestresste Knockout-Mäuse (+Cre) mit gestressten Knockout-Mäusen (Balken 5 und 6) und gestresste Wildtyp-Mäusen mit gestressten Knockout-Mäusen (Balken 7 und 8). Zur Übersicht sind auch die (FExpressionsdaten von nicht-gestressten Wildtyp-Mäusen verglichen mit nicht-gestressten Knockout-Mäusen dargestellt (Balken 1 und 2). Die unterbrochene Linie zeigt zur Orientierung den Wert 1 an, bei dem sich die Expression nicht unterscheidet. Die statistische Auswertung befindet sich im Anhang 6.2.

4.1.7 CRH-abhängige Expression des RIKEN Klons 2610042L04

In einem unabhängigen Experiment in unserem Labor wurden die Genexpression CRH-behandelter AtT-20 Zellen mit einem *Microarray*-Experiment analysiert. Bei den AtT-20 Zellen handelt es sich um ein Hypophysen-Tumorzellinie, die vielfach für die Analyse CRH-abhängiger Signalprozesse verwendet wird. Hier konnte gezeigt werden, dass die Expression des RIKEN Klons 2610042L04 in Zellen, die 6 Stunden mit CRH behandelt wurden, verstärkt ist (3,21-fach). Um dieses Ergebnisse zu verifizieren und außerdem die Größe des regulierten Transkripts zu bestimmen, da von diesem Gen verschiedene Spleißvarianten existieren, wurde eine *Northern Blot* Analyse durchgeführt. Für dieses Experiment wurde RNA von AtT-20 Zellen verwendet, die 1, 3, 6 und 24 Stunden mit CRH behandelt worden sind. Der *Northern Blot* zeigt, dass in den Zellen unterschiedlich lange Transkripte exprimiert werden (Abbildung 4.1-9). Eine Analyse der Genstruktur des RIKEN Klons mit Hilfe des öffentlich zugänglichen

Mausgenoms (www.ensembl.org) ergab eine sehr komplexe Situation. Von dem RIKEN Klon 2610042L04 existieren mehrere Genkopien auf Chromosom 14 und diese werden wiederum in verschiedene Transkripte gespleißt. Grundsätzlich gibt es zwei Transkriptlängen, die bei etwa 1.9 und 2.1 Kb liegen. Das konnte auch mit diesem *Northern Blot* gezeigt werden (Abbildung 4.1-9). Eine definierte Bande zeigt sich bei etwa 1.9 Kb. Auf der Höhe von etwa 2.1 Kb zeigt sich ein diffuseres Signal, welches auf mehrere Transkripte mit etwa dieser Länge hinweisen könnte.

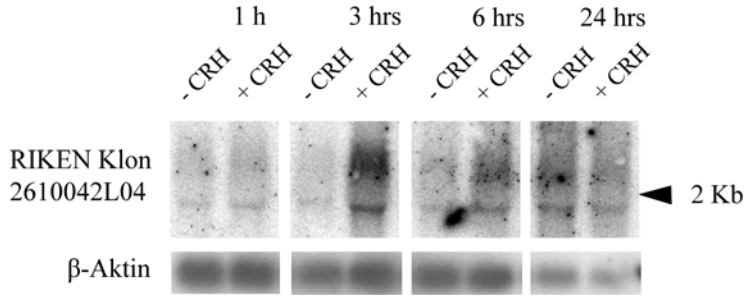


Abbildung 4.1-9: *Northern Blot* Analyse der Expression des Riken Klon 2610042L04 in AtT-20 Zellen.
8 µg RNA aus unbehandelten und CRH-behandelten AtT-20 Zellen wurden auf ein Gel aufgetragen. Zur Normalisierung der Werte wurde der Blot mit einer β-Aktin-Sonde hybridisiert. Die Signale der Transkripte wurden mit einem Phosphoimager quantifiziert (Abbildung 4.1-10).

.

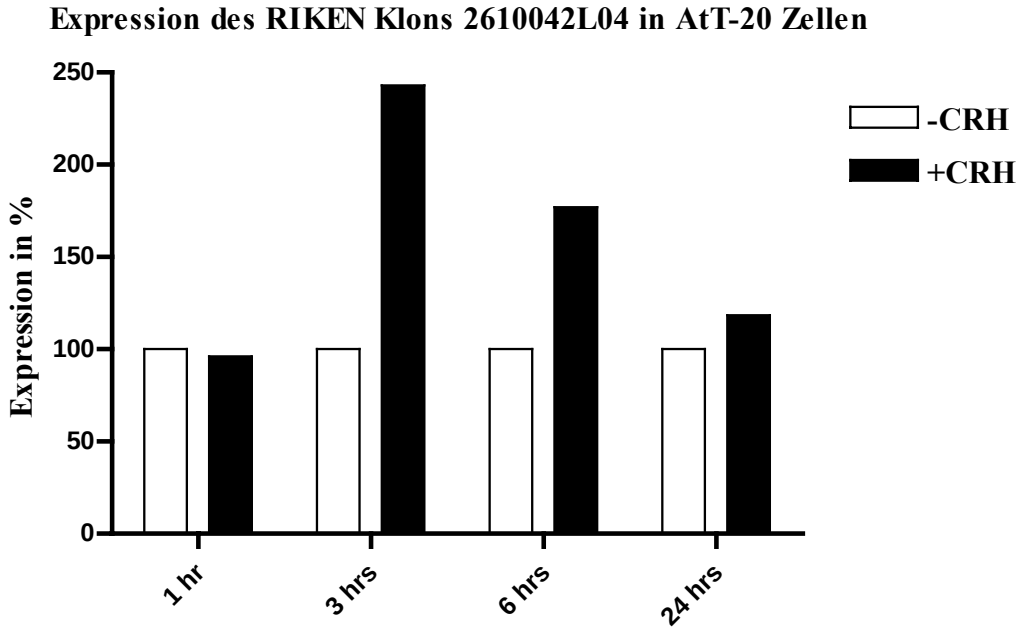


Abbildung 4.1-10: Quantifizierung der Expression des RIKEN Klons 2610042L04 in AtT-20 Zell nach CRH-Behandlung.
Die *Northern Blot* Signale (Abbildung 4.1-9) wurden mit einem Phosphorimager quantifiziert und mit dem ß-Aktin-Signal normalisiert. Die Expressionsstärke in CRH-behandelten AtT-20 Zellen wird prozentual im Vergleich zu unbehandelten AtT-20 Zellen angegeben.

Die Analyse der Signalstärken der Transkripte durch Normalisierung mit ß-Aktin konnte zeigen, dass die relative mRNA Expression des RIKEN Klons 2610042L04 nach 3 Stunden um den 2,5-fachen Wert heraufreguliert wurde. Nach 24 Stunden hat sich der Unterschied zwischen unbehandelten und CRH-behandelten Zellen wieder normalisiert. Diese Tendenz konnte für die Transkripte bei 1.9 Kb und 2.1 Kb als auch für die Signalstärke der Gesamtheit der Transkripte festgestellt werden (Abbildung 4.1-10).

Bei dem RIKEN Klon 2610042L04 handelt es sich demnach um mehrere Transkripte, die CRH-abhängig in AtT-20 Zellen reguliert werden. Die Sonde, die hier für den *Northern Blot* verwendet wurde detektiert einen Abschnitt in der nichttranslatierten 3´-Region (3´-UTR) des RIKEN Klons. Im Gegensatz dazu wurde mit der qRT-PCR ein Bereich zwischen Exon 5 und Exon 6 amplifiziert.

4.2 Ergebnisse der *Yeast two-hybrid*-Suche

4.2.1 Identifizierung potentieller Interaktionspartner der carboxy-terminalen cytoplasmatischen Domäne des CRH-R2 mit dem *Yeast two-hybrid*-System

Um nach Proteinen zu suchen, die mit der carboxyterminalen (C-terminalen) cytoplasmatischen Domäne des CRH-R2 interagieren und daher möglicherweise in CRH-R2-abhängige Signalprozesse involviert sind, wurde eine *Yeast two-hybrid*-Suche durchgeführt.

4.2.2 Klonierung der C-terminalen Domäne des CRH-R2

Zunächst wurde die cDNA der C-terminalen Domäne des Rezeptors hergestellt und in den Vektor pGBKT7 kloniert. Die cDNA, die für die Aminosäuren 380-431 der C-terminalen Domäne des CRH-R2 kodiert, wurde vom Plasmid pKS_CRF2-R mit den Primern "*Eco*RI_3xG_CRF2-R_1266_5´" und "*Bam*HI_CRF2-R_1424_3´" amplifiziert und über EcoRI und BamHI in pGBKT7 subkloniert. Das entstandene Konstrukt, pGBKT7_CRF2-R_cytoplasmic (pGBKT7_cy2), wurde durch Sequenzierungen bestätigt. Diese Klonierung wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Maik Engeholm durchgeführt (Engeholm, 2002).

4.2.3 Expression der C-terminalen Domäne des CRH-R2 in Hefe

Um eine *Yeast two-hybrid*-Suche durchzuführen, musste zunächst ausgeschlossen werden, dass die C-terminale Domäne des CRH-R2 nicht selbstständig zu einer Aktivierung der Reportergene führen kann. Dafür wurde zunächst ein Hefeklon etabliert, der das Protein als Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4 stabil exprimiert.

Der pGBKT7_cy2 wurde mittels der LiAc-Methode (siehe 3.6.3) in AH109 transformiert und die Hefen, die das Plasmid aufgenommen haben, in tryptophanfreiem Medium selektiert. Die Anwesenheit von pGBKT7_cy2 beeinträchtigt das Wachstum dieser Hefen in Vollmedium nicht. In sechs unabhängigen Klonen wurde der Aktivierungszustand der Reportergene überprüft: Keiner dieser sechs Klone zeigte Wachstum auf tryptophan- und histidin- oder tryptophan- und adeninfreien Agarplatten, und keiner der Klone bildete blaue Kolonien auf X-α-Gal-haltigen Agarplatten (Engeholm, 2002).

4.2.4 Durchsuchen einer *Yeast two-hybrid*- cDNA Bibliothek nach Interaktionspartnern der C-terminalen Domäne des CRH-R2

Es wurde hier die in den Y187 Hefestamm prätransformierte cDNA Bibliothek aus dem Gesamthirn der Maus verwendet (Clontech). Um diese cDNA Bibliothek nach Proteinen zu durchsuchen, die an die C-terminale Domäne des CRH-R2 binden können, wurde dieser prätransformierte Hefestamm mit AH109_pGBKT7_cy2 verpaart und die diploiden Hefen auf die Anwesenheit von interagierenden Hybridproteinen selektiert.

AH109_pGBKT7_cy2 wurde mit dem Hefestamm Y187, der die prätransformierten cDNA Bibliothek enthält, verpaart. Dieser Verpaarungsansatz wurde auf fünfzig X-α-Gal haltigen, tryptophan-, leucin-, histidin- und adeninfreie Selektionsplatten ausgebracht.

Nach 3 Tagen konnte auf den Selektionsplatten das Wachstum der ersten Kolonien beobachten werden. Nach etwa einer Woche konnten 100 Kolonien gezählt werden. Blaugefärbte Kolonien wurden nicht beobachten. Für die weitere Analyse wurden 60 Klone gewählt. Eine Übersicht der einzelnen Kolonien zeigt Tabelle 4.2-1. Von diesen Platten wurde der jeweilige Klon erneut auf einer tryptophan-, leucin-, histidin- und adeninfreie Selektionsplatte ("Masterplatte") ausgestrichen. Von diesen Platten wurde eine Einzelkolonie in jeweils 5 ml Selektionsmedium kultiviert. Einige Klone sind nicht erneut auf den Platten gewachsen und wurden daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Von diesen Kulturen wurde Plasmid-DNA isoliert und in elektrokompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Anschließend wurden die Plasmid-DNA von jeweils drei Klonen je Transformation weiter analysiert. Diese DNA wurde mit den Enzymen *Eco*RI und *Xho*I, die für die Klonierung der cDNA-Bibliothek in pACT2 verwendet wurden, verdaut. Neben der 8,1 Kb pACT2 Vektor-Bande wurde eine zweite Bande erwartet, die dem jeweiligen cDNA Insert entspricht. Bei einem identischen Restriktionsmuster wurde das Plasmid von einem dieser drei Klone für die weitere Analyse verwendet (Abbildung 4.2-1). Entstehen bei dem Verdau mit *Eco*RI und *Xho*I zwei oder mehr Insertbanden, so deutet dies darauf hin, dass bei der Klonierung mehrere unabhängige cDNAs in pACT2 inseriert wurden. In solch einem Fall wurden diese Kandidaten von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

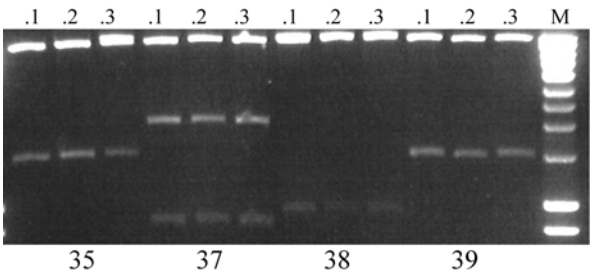


Abbildung 4.2-1: Restriktionsanalyse der Bibliotheksplasmide durch Verdau mit *Eco*RI und *Xho*I. Die Bande bei 8.1 Kb entspricht dem Vektor pACT2, die kleineren Banden jeweils der in den Vektor klonierten cDNA. Gezeigt wird repräsentativ der Verdau von drei *E. coli* Klonen (.1, .2, .3) des jeweiligen cDNA Klons (35, 37, 38, 39) aus der Hefe. M= SmartLadder

4.2.5 Identifizierung falsch positiver Klone in der Hefe

Bei einer *Yeast two-hybrid*-Suche ist es möglich, dass Proteine in der Hefe die Reportergene aktivieren, ohne dass jedoch eine physiologisch relevante Interaktion mit dem Protein, welches mit der GAL4 Domäne fusioniert wurde, vorliegt. Solche Klone werden als "falsch positiv" bezeichnet (Colas und Brent, 1998; Serebriski et al., 2000).

Um diese "falsch positiven" Klone zu identifizieren und von weiteren Experimenten auszuschließen, wurden 42 Klone, die in der primären Suche identifiziert wurden und bei denen die weitere Prozessierung erfolgreich war (siehe Tabelle 4.2-2), in den Hefestamm Y187 retransformiert. Für die weitere Analyse wurde dann das humane Lamin C als Kontrollprotein verwendet, welches Bestandteil der nukleären Lamina ist. Da für dieses Protein bisher keine Interaktoren nachgewiesen werden konnten und es mit dem CRH-R2 nicht verwandt ist, kann eine Interaktion mit CRH-R2 mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (Ye und Worman, 1995).

Klon	Tag des Auftretens	Master-platte	Plasmid-präparation	Transformation in E. coli	Insert (Bp)	Retransformation in Hefe	Verifizierung in Hefe
1	3	+	+	+	1000	1.1.	falsch positiv
2	5	+	+	+	1500/600	2.1.	bestätigt
3	5	/	/	/	/	/	/
4	5	+	+	+	1800	4.1.	bestätigt
5	5	+	+	+	600	5.1.	bestätigt
6	5	+	+	+	1800	6.1.	falsch positiv
7	5	+	+	+	1500	7.1.	bestätigt
8	5	+	+	+	600	8.2.	falsch positiv
9	5	+	+	+	600	9.2.	falsch positiv
10	5	+	+	+	2500	10.1.	falsch positiv
11	5	+	+	+	3000	11.1.	bestätigt
12	5	+	+	+	2000	12.1.	falsch positiv
13	5	/	/	/	/	/	/
14	5	+	+	+	/	/	/
15	5	+	+	/	/	/	/
16	5	+	+	+	1300	16.1.	bestätigt
17	6	+	+	+	2400	17.1.	bestätigt
18	6	+	+	+	2400	18.1.	bestätigt
19	6	+	+	+	1200	19.1.	falsch positiv
20	6	+	+	+	2700	20.1.	falsch positiv
21	6	+	+	+	/	/	/

Klon	Tag des Auftretens	Master-platte	Plasmid-präparation	Transformation in E. coli	Insert (Bp)	Retransformation in Hefe	Verifizierung in Hefe
22	6	+	+	+	1700	22.1.	falsch positiv
23	6	+	+	+	1700	23.1.	falsch positiv
24	6	+	+	+	1700	24.1.	falsch positiv
25	6	+	+	+	/	/	/
26	6	+	+	+	/	/	/
27	6	+	+	+	/	/	/
28	6	+	+	+	1900	28.1.	falsch positiv
29	6	+	+	+	1000	/	/
30	6	+	+	+	900	30.1.	falsch positiv
31	6	+	+	+	2400	31.1.	falsch positiv
32	6	+	+	+	4500	32.1.	falsch positiv
33	6	+	+	+	1700	33.1.	falsch positiv
34	6	+	/	/			/
35	6	+	+	+	1600	35.1.	falsch positiv
36	6	+	+	+	1700	36.1.	falsch positiv
37	7	+	+	+	900/500	37.1.	falsch positiv
38	7	+	+	+	1000	38.1.	bestätigt
39	7	+	+	+	1600	39.1.	falsch positiv
40	7	+	+	+	2000	40.1.	falsch positiv
41	7	/	/	/			/
42	7	+	+	+	2000	42.1.	bestätigt
43	7	+	+	+	1300	43.1.	falsch positiv
44	7	+	+	+	1300	44.1.	bestätigt
45	7	+	+	+	700	45.1.	bestätigt
46	7	/	/	/	/	/	/
47	7	+	/	/	/	/	/
48	7	+	+	+	1100	48.1.	bestätigt
49	8	+	+	+	800	49.1.	falsch positiv
50	8	+	+	+	1500	50.1.	falsch positiv
51	8	/	/	/	/	/	/
52	8	+	+	+	2500	52.1.	falsch positiv
53	8	+	+	+	700	53.1.	falsch positiv
54	8	+	+	+	1500	54.1.	falsch positiv
55	8	+	+	+	2500	55.1.	bestätigt
56	8	/	/	/	/	/	/
57	8	+	+	+	1500	/	/
58	8	+	+	+	1700	/	/
59	8	/	/	/	/	/	/
60	8	+	+	+	1700	60.1.	falsch positiv

Tabelle 4.2-1: Übersicht der Kolonien der *Yeast two-hybrid*-Suche.
Dargestellt sind alle Kolonien, die für die weitere Analyse verwendet wurden. Spalte 2 und 3 beschreiben das Wachstum der Hefekolonien auf tryptophan-, leucin-, histidin-, und adeninfreien Selektionsplatten, wobei Spalte 2 den Tag des ersten Auftretens nach Ausplattieren des diploiden Hefeverpaarungsansatz angibt und Spalte 3 zeigt, ob ein erneutes Wachstum auf den Selektions-"Masterplatten" stattgefunden hat. Spalte 4, 5 und 6 geben an, ob die Plasmidpräparation aus dem Hefestamm und die Retransformation in *E. coli* erfolgreich waren und wie groß das Insert ist. Spalte 7 und 8 zeigen, welche Klone in die Hefe retransformiert wurden und ob eine Verifizierung der Interaktion in der Hefe erfolgreich (Abbildung 4.2-3) war.

Der Vektor pGBKT7-Lamin (Clontech) wurde in den Hefestamm Y187 transformiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Hefestamm verwendet, in den der ursprüngliche pGBTK7 Vektor ("Leerkontrolle") transformiert wurde. Folgende Verpaarungen wurden für diesen Versuch in kleinem Maßstab angesetzt:

1. pACT2_cDNA in Y187 + pGBKT7_cy2 in AH109
2. pACT2_cDNA in Y187 + pGBKT7_Lam in AH109

3. pACT2_cDNA in Y187 + pGBKT7 in AH109

Dieser Verpaarungsansatz wurde nach 8 Stunden 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und 10 µl davon auf tryptophan-, leucin-, histidin- und adeninfreien Selektionsplatten ausgebracht, um zu überprüfen, ob die Reportergene aktiviert werden. Dieser Ansatz wurde außerdem auf leucin- und tryptophanfreie Agarplatten ausgebracht, um zu zeigen, dass die verschiedenen Hefestämme mit etwa gleicher Effizienz verpaart wurden. Die drei Verpaarungsansätze wurden in der gleichen Anordnung auf die Platten aufgetragen, um sie direkt miteinander vergleichen zu könne. Die Effizienz der Verpaarungen der cDNA Bibliotheksklone im Y187 Hefestamm mit den Hefestämmen AH109_pGBKT7_cy2, AH109_pGBKT7 und AH109_pGBKT7_Lam war in etwa gleich (Abbildung 4.2-2). Von den insgesamt 42 Klonen konnte bei 10 Klonen das Auftreten von Kolonien nach Koexpression mit pGBKT7_cy2 beobachtet werden (Abbildung 4.2-3). In den Kontrollverpaarungsansätzen dieser Klone traten auch bei geringer Verdünnung keine Kolonien auf. Bei den anderen 32 Klonen wurden die Reportergene auch durch Interaktion mit den Negativkontrollplasmiden aktiviert. Diese Klone wurden von der weitere Analyse ausgeschlossen.

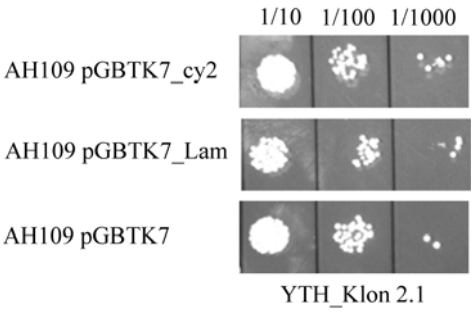


Abbildung 4.2-2: Verpaarungseffizienz nach Wiederverpaarung ausgewählter Hefekolonien. Repräsentativ wird der Verpaarungsansatz des YTH-Klons 2.1 mit den verschiedenen AH109 Stämmen gezeigt, die in drei Verdünnungen (1/10, 1/100, 1/1000) auf tryptophan- und leucinfrei SD-Platten aufgetragen wurden.

Die cDNA-Bibliotheksklone, bei denen eine spezifische Interaktion mit der C-terminalen Domäne des CRH-R2 erneut bestätigt und eine unspezifische Aktivierung in diesem Versuch ausgeschlossen werden konnte, wurden mit dem "Gal4p-sequencing" Primer sequenziert. Die Sequenzen repräsentieren den 5´-Bereich der cDNA, der sich an die Aktivierungsdomäne der GAL4 cDNA anschließt. Diese Sequenzen wurden mittels BLAST-Suche in der NCBI Datenbank auf NR (*non redundant*)-Homologien mit bekannten Genen oder ESTs untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2-2 dargestellt. Die kodierenden Aminosäuren beschreiben die Zahl der Aminosäuren, die sich im korrekten Protein-Leserahmen des Vektors pACT2 befinden. Es ist aber bekannt, dass beim *Yeast two-hybrid*-System auch alternative Leserahmen translatiert werden, die gegebenfalls in der Tabelle aufgeführt sind.

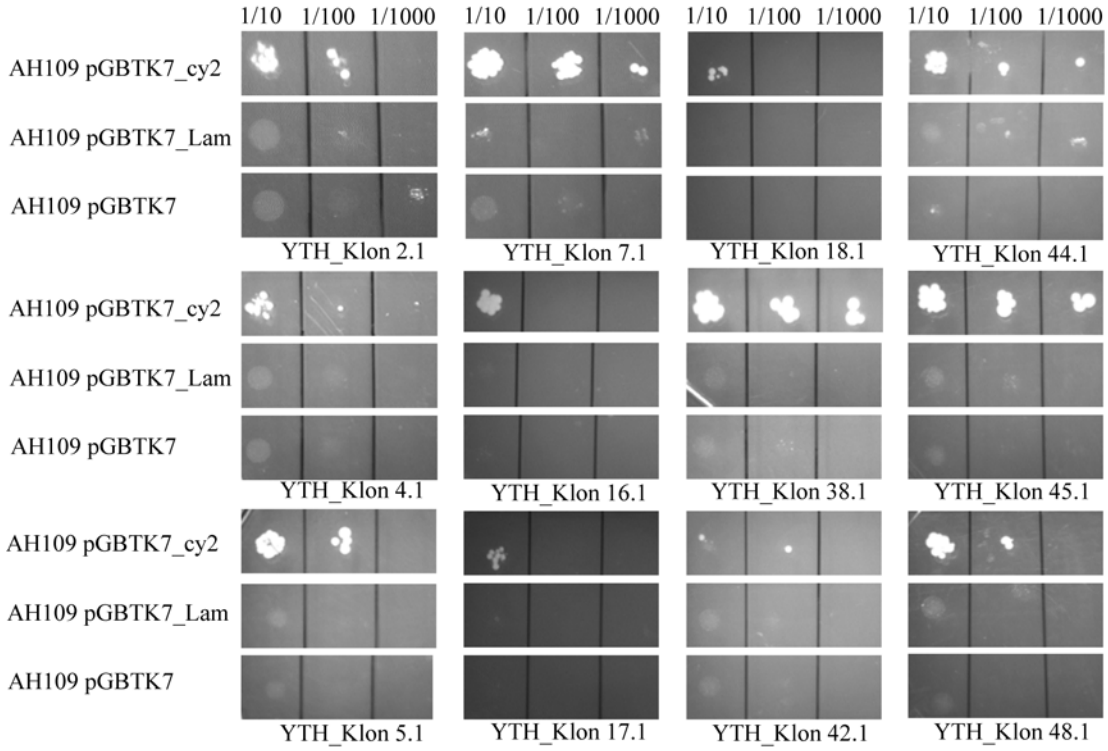


Abbildung 4.2-3: Verifizierte Interaktionpartner der C-terminalen Domäne des CRH-R2 in der Hefe. Die durch Retransformation der Bibliotheksplasmide in Y187 gewonnenen Klone wurden jeweils mit AH109 pGBKT7_ cy2, AH109_pGBKT7_Lam und AH109_pGBKT7 verpaart. Drei Verdünnungsstufen (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) dieser Verpaarungsansätze wurden auf tryptophan-, leucin-, adenin-, und histidinfreie Agarplatten als 10 µl "Tropfen" ausgebracht. Dargestellt sind die Platten der Klone, bei denen die Reportergene nur in dem Verpaarungsansatz mit AH109_pGBKT7 _cy2 aktiviert wurde. Die Abbildungen für Klon 11.1 und 55.1 fehlen.

Bei zwei von den in der Hefe verifizierten Kandidaten handelt es sich um mitochondriale Proteine: DNA-Polymerase γ (Polg) und ATP-Synthase, *mitochondrial F1 complex*, λ (Atp5d). Mitochondriale Proteine sind typische falsch positive Kandidaten, die imYTH-System identifiziert werden (http://www.fccc.edu:80/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork/html). Bei 4 Klonen (5.1, 17.1, 18.1, 42.1, 48.1) hat die BLAST-Analyse keine Homologien zu bekannten Genen oder ESTs ergeben, wobei es sich bei Klon 17.1 und 18.1 um identische Sequenzen handelt. Für die Sequenzen von Klon 2.1, 16.1 und 45.1 konnten homologe ESTs gefunden werden, die einem Unigenecluster zugeordnet sind. Bei den Klonen 4.1, 44.1 und 55.1 konnten mit der BLAST-Suche homologe Gene gefunden werden. Bei Klon 4.1 handelt es sich um die Carboxypeptidase E (Cpe), ein Enzym, welches bei proteolytischen Prozessen eine Rolle spielt. Zu beachten ist, dass hier der alternative Leserahmen für das Protein kodiert. In sekretorischen Vesikeln in neuroendokrinen Geweben spaltet es die C-terminalen Arginin- und Cystein-Reste von verschiedenen Peptiden und reguliert damit ihre Aktivität (Fricker, 1998; Cool et al., 1997; Cool und Loh 1998).

YTH Klon	Referenz-Nummer[1]	Genname (Symbol)[2]	Kodierende Aminosäuren[3] (alternativer Leserahmen)
2.1	CD_353736	Unigenecluster Mm. 241700: Glycoprotein m6-a (Gpm6a)	45 aa
4.1	NM_033494	Carboxypeptidase E (Cpe)	20 aa (200 aa)
5.1	AC163665.4	-	70 aa
7.1	NM_017461	DNA Polymerase γ (Polg), mitochondrial	190 aa
11.1	NM_026421	RIKEN cDNA 2310057D15 gene	120 aa
16.1	BY_733704	Unigenecluster Mm.6478: Pam, highwire, rpm1 (Phr1)	63 aa
17.1	AC115945.9	-	44 aa
18.1	AC115945.9	-	44 aa
38.1	NM_025313	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, λ (Atp5d)	200 aa
42.1	AC134830.2	-	-
44.1	NM_010312	Guanine nucleotide binding-protein, beta-2 subunit (Gnb2)	200 aa
45.1	BC_018196	Unigenecluster Mm. 272498: RIKEN cDNA 1810620C19Rik gene	140 aa
48.1	AK148164.1	-	50 aa (60 aa)
55.1	NM_198710	Synaptophysin-like protein (Syp1), Pantophysin, Transkriptvariante 2	59 aa (243 aa)

Tabelle 4.2-2: Identifizierung der in Hefe verifizierten Interaktoren.
Auflistung der Klone, die mit dem *Yeast two-hybrid*-Suche als Interaktionspartner mit der cytoplasmatischen Domäne des CRH-R2 identifiziert werden konnten.
[1] Die Referenznummern beziehen sich auf die entsprechenden Einträge in der NCBI-Datenbank nach BLAST-Suche. Bei Klon 5.1, 17.1/18.1, 42.1 und 48.1 konnten nur genomische Sequenzen gefunden werden, die entsprechende Accession-Nummer ist aufgelistet.
[2] Gennamen und Symbol entsprechend der Einträge in der "Jackson Laboratory Mouse Genome Informatics" Datenbank (www.informatics.jax.org).
[3] Kodierende Aminosäuresequenz im Leserahmen bzw. alternativer Leserahmen des Vektors der *Yeast two-hybrid*-Klone

Desweiteren konnte die Beta-Untereinheit des *Guanine nucleotide binding* Proteins (Gnb2, Klon 44.1) als möglicher Interaktionspartner des CRH-R2 identifiziert werden. *Guanine nucleotide binding* Proteine sind in die Signaltransduktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, zu der auch die CRH-Rezeptoren gehören, involviert (Cabrera-Vera et al., 2003). Sie bestehen aus drei Untereinheiten, Gα, Gβ und Gγ. Gnb2 gehört außerdem zur Familie der WD-40 Wiederholungen (auch bekannt als beta-Transducin-Wiederholungen) und konnte kürzlich als Interaktionspartner von Glucocorticoid-Rezeptoren identifiziert werden (Clapham und Neer 1997; Kino et al., 2005). Ein weiterer Kandidat, der als potentieller Interaktionspartner identifiziert wurde, ist *Synaptophysin-like protein* bzw. Pantophysin (Sypl), welches als integrales Membranprotein in cytoplasmatischen Transportvesikeln in neuronalen Zellen und in neuroendokrinen Geweben exprimiert wird (Haass et al., 1996). Bei dem hier vorliegenden *Yeast two-hybrid*-Klon handelt es sich um die Transkriptvariante 2 des Gens, welches für die Pantophysin-Isoform 2 (NP_942003) kodiert.

Die DNA-Sequenz des *Yeast two-hybrid*-Klon 11.1 stimmt mit der Sequenz des RIKEN Klon 2310057D15 überein. Die Analyse der Proteinsequenz des Klons ergab, dass der Leserahmen des pACT2 Vektors nur mit einem Teil des Exons 1 des RIKEN Klons übereinstimmt. Der alternative Leserahmen des Vektors ist homolog zu Exon 2 und 3 des RIKEN Klons (siehe Abbildung 4.2-6). Es könnte sich hier um eine bisher nicht beschriebene Spleißvariante handeln. Es wäre aber auch möglich, dass durch fehlerhaft Sequenzierung des RIKEN Klons 2310057D15, eine Verschiebung des Leserahmens entstanden ist. Vergleicht man nämlich den *Yeast two-hybrid*-Klon mit der publizierten Sequenz des RIKEN Klons auf DNA-Ebene, so ergeben sich einzelne Unstimmigkeiten (*mismatches*).

4.2.6 Validierung der Protein-Protein Interaktion mit einer unabhängigen Methode

Protein-Protein-Interaktionen, die mit dem *Yeast two-hybrid*-System identifiziert wurden, müssen mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden, um die Möglichkeit auszuschließen, dass zum Beispiel spezielle Hefe-Proteine diese Interaktion vermittelt haben.

Es wurde hier die Methode des GST (Glutathion S-Transferase)-*pull-down* gewählt, bei der die C-terminale Domäne des CRH-R2 als Fusion mit dem GST-Protein exprimiert wurde und die potentiellen Interaktoren in einem *in vitro* Translationsansatz im Retikulocytenlysat hergestellt und mit radioaktiven ^{35}S-Methionin markiert wurden (siehe Abbildung unter Methoden 3-2).

4.2.7 Expression der C-terminalen Domäne als GST-Fusionsprotein

Der cDNA Abschnitt, der für die C-terminale Domäne kodiert, wurde in den pGEX-4T-2 Vektor (Amersham) kloniert, so dass sich die Sequenz im korrekten Leserahmen für das Protein befindet. Bei diesen pGEX Vektoren unterliegt die Expression dem *tac* Promotor, dessen Aktivität durch das Laktoseanalog Isopropyl b-D Thiogalaktosid (IPTG) kontrolliert wird.

Dafür wurde die Sequenz mit den Primern "mCRH_R2cyGSTfus5´" und "mCRH_R2cyGSTfus3´" von dem Vektor pGBKT7_cy2 amplifiziert und nach einem Verdau mit den Enzymen *Eco*RI und *Xho*I mit pGEX-4T-2 ligiert. Dieser Vektor pGEX-4T-2_cy2 wurde in den chemisch-kompetenten *E. coli* Stamm Rosetta (DE3) (Novagen), einem Derivat des BL21 *lacY1* Mutantenstamms, transformiert. Dieser Bakterienstamm hat die Eigenschaft, dass hier die Expression von Proteinen verstärkt wird, die Aminosäuren enthalten, die von Codons kodiert werden, die in *E. coli* selten benutzt werden.

Für die Negativkontrolle wurde außerdem der Vektor pGEX-4T-2 ohne Fusionsprotein in diesen *E. coli* Stamm transformiert. Die Expression des Fusionsproteins in verschiedenen Klonen wurde zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Nach IPTG-Zugabe wurde die GST und GST_cy2 Fusionsprotein-Expression in den Bakterienstämmen induziert (Abbildung 4.2-4, GST +IPTG und GST_cy2 +IPTG). Die Größe der Banden entsprechen etwa dem Molekulargewicht des GST-Proteins (26 kDa) und dem GST_cy2 Fusionsprotein (~ 32 kDa). In der nach Lyse der Bakterien nichtlöslichen Fraktion bleibt eine erhebliche Menge Fusionsproteins zurück (Abbildung 4.2-4, GST_cy2 Pellet). Anschließend wurden die Proteine in den Bakterienlysaten mit Glutathion-Sepharose affinitätsaufgereinigt. Die an die Sepharose gebundenen Proteine wurden mit einem Puffer eluiert und die entsprechenden Eluate wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Es zeigt sich, dass die GST-Proteine in den Bakterien exprimiert wurden und aufgereinigt werden konnten (Abbildung 4.2-4, GST Eluat). Das GST-Protein, welches mit der C-terminalen Domäne des CRH-R2 fusioniert wurde, wurde im Vergleich dazu eher schwach exprimiert (Abbildung 4.2-4, GST_cy2 Eluat). Es sind außerdem noch weitere Banden zu erkennen. Diese könnten durch proteolytische Spaltung oder Denaturierung des Fusionsprotein entstanden sein.

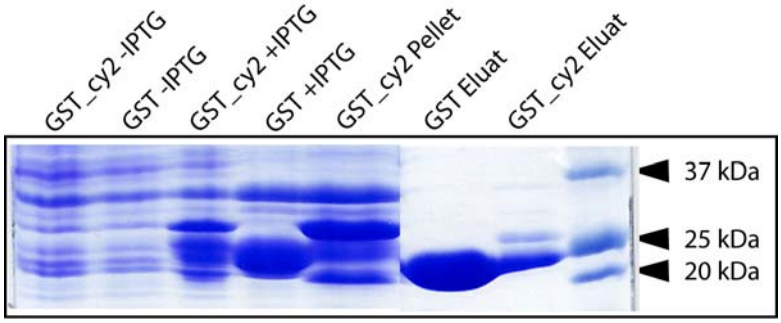


Abbildung 4.2-4: Analyse der Expression von GST und GST_cy2 Fusionsprotein in *E. coli.*
Proteinextrakte aus *E. coli* Kulturen wurden vor (-IPTG) und nach (+IPTG) IPTG-Expressionsinduktion mittels SDS-Gelelektophorese analysiert. Es wurden außerdem Fraktionen aufgetragen, in denen sich das nichtlösliche Pellet befindet. In den zwei vorletzten Spuren befindet sich die Proteinfraktion, welche von den Sepharose-Kügelchen eluiert wurde. Die Proteine wurden durch Coomassie Brilliant Blau Färbung sichtbar gemacht.

Um nachzuweisen, dass es sich hier tatsächlich um die Expression der Fusionsproteins aus GST und C-terminaler Domäne des CRH-R2 handelt, wurde die Identität der Proteine in den einzelnen Fraktionen mittels Immundetektion bestimmt. Dafür wurde ein Antikörper verwendet, der das GST-Protein spezifisch erkennt und ein weiterer Antikörper, mit dem die C-terminale Domäne des CRH-Rezeptoren 1 und 2 detektiert werden kann.

Es wurden Lysate von Bakterienkulturen vor und nach IPTG-Zugabe auf eine Nylonmembran geblottet und mit einem CRH-R-Antikörper und anschließend mit dem GST-Antikörper inkubiert (Abbildung 4.2-5A). Das GST-Fusionsprotein konnte in IPTG-induzierten Bakterienkulturen mit dem CRH-R-Antikörper detektiert werden (anti CRH-R, GST_cy2 +IPTG). Nach Inkubation mit dem GST-Antikörper kann das GST-Protein sowohl in Bakterienlysaten, die das GST-Protein exprimieren, als auch in Lysaten, die das Fusionsprotein exprimieren, nach IPTG-Induktion nachgewiesen werden (anti GST, GST + IPTG und GST_cy2 +IPTG). Es konnte hier also gezeigt werden, dass die Bakterien das GST_cy2 Fusionsprotein, wenn auch deutlich schwächer als das native GST-Protein, exprimieren. Im Anschluß daran haben wir auch die Ansätze mit den aufgereinigten Proteinen untersucht (Abbildung 4.2-5B). Auch hier kann gezeigt werden, dass nur in den Fraktionen, die aus den Bakterien, die das Plasmid pGEX-4T-2_cy2 exprimieren, die C-terminale Domäne mit dem Antikörper detektierbar ist (GST_cy2 Eluat 1 und 2), nicht aber in denen das Kontrollplasmid exprimiert wurde (GST Eluat 1 und 2).

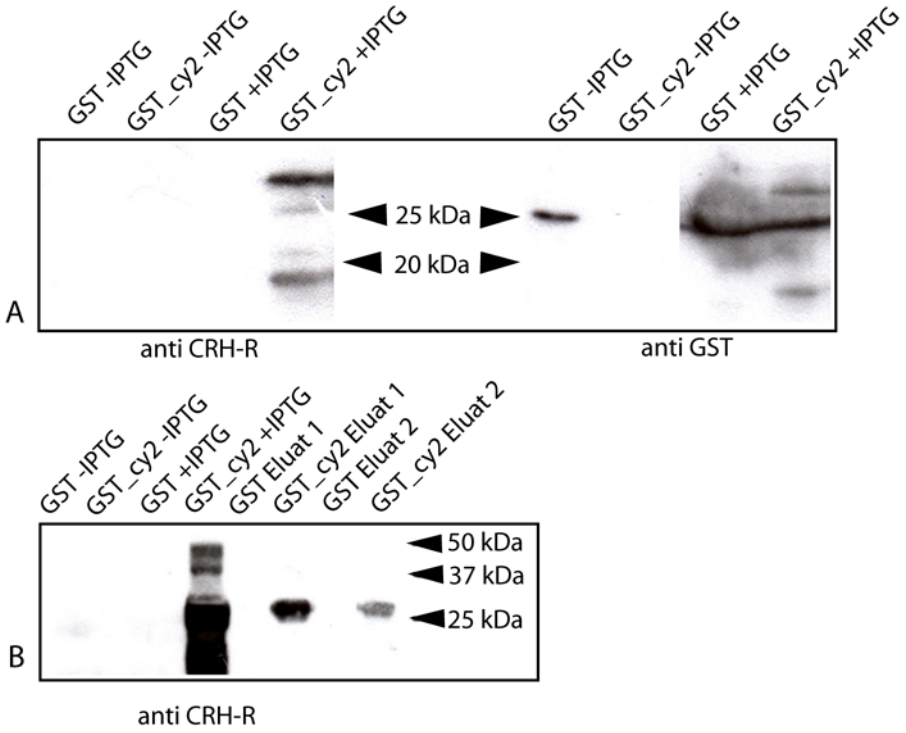


Abbildung 4.2-5: Analyse der Expression des GST-Fusionsproteins mittels Western Blot und Immundetektion.
A. Bakterienlysate, die das GST-Protein bzw. das GST_cy2 Fusionsprotein exprimieren, wurden mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit dem CRH-R-Antikörper CRF-R1 (H-215) (linke Hälfte der Abbildung) und nachdem dieser entfernt wurde, mit dem GST-Antikörper (rechte Hälfte der Abbildung) inkubiert. **B.** Proteinfraktionen vor und nach Inkubation mit Sepharose-Kügelchen und zwei Eluierungsschritten (Eluat 1 und 2).

4.2.8 GST-*pull-down*

Für eine Verifizierung der Protein-Protein-Interaktion mit der C-terminalen Domäne haben wir die vier folgenden Kandidaten aus der *Yeast two-hybrid*-Suche gewählt: Carboxypeptidase E (YTH_Klon 4.1), RIKEN cDNA 2310057D15 Gen (YTH_Klon 11.1), *Guanine nucleotide binding protein, beta-2 subunit* (YTH_Klon 44.1), *Synaptophysin-like protein* bzw. Pantophysin (YTH_Klon 55.1) (Abbildung 4.2-6).

Zunächst wurde die cDNA-Sequenz dieser Kandidatengene von dem Vektor pACT2 amplifiziert und entsprechend mit dem Vektor pGADT7 ligiert, so dass eine Transkription unter Kontrolle des T7 Promotors in dem entsprechenden Proteinleserahmen stattfindet. Dafür wurde die cDNA von Carboxypeptidase E von dem pACT2_4.1 mit den Primern "ythc4.1_insert_forward2" und "ythc4.1_insert_reverse" amplifiziert, mit *Eco*RI und *Xho*I verdaut und mit pGADT7 ligiert. Entsprechend wurden die anderen Kandidatengene mit den Primern "ythc11.1_insert_forward2/ythc11.1_insert_reverse2" (Riken cDNA 2310057D15),

"ythc44.1_insert_forward2/ythc44.1_insert_reverse2" (Gng) und "ythc55.1_insert_forward2/ ythc55.1_insert_reverseB" (Syp1) in pACT2 umkloniert. Der Klon 55.1 wurde mit *Eco*RI und *Bam*HI verdaut, da die cDNA des Bibliotheksplasmids interne *Xho*I-Schnittstellen besitzt.

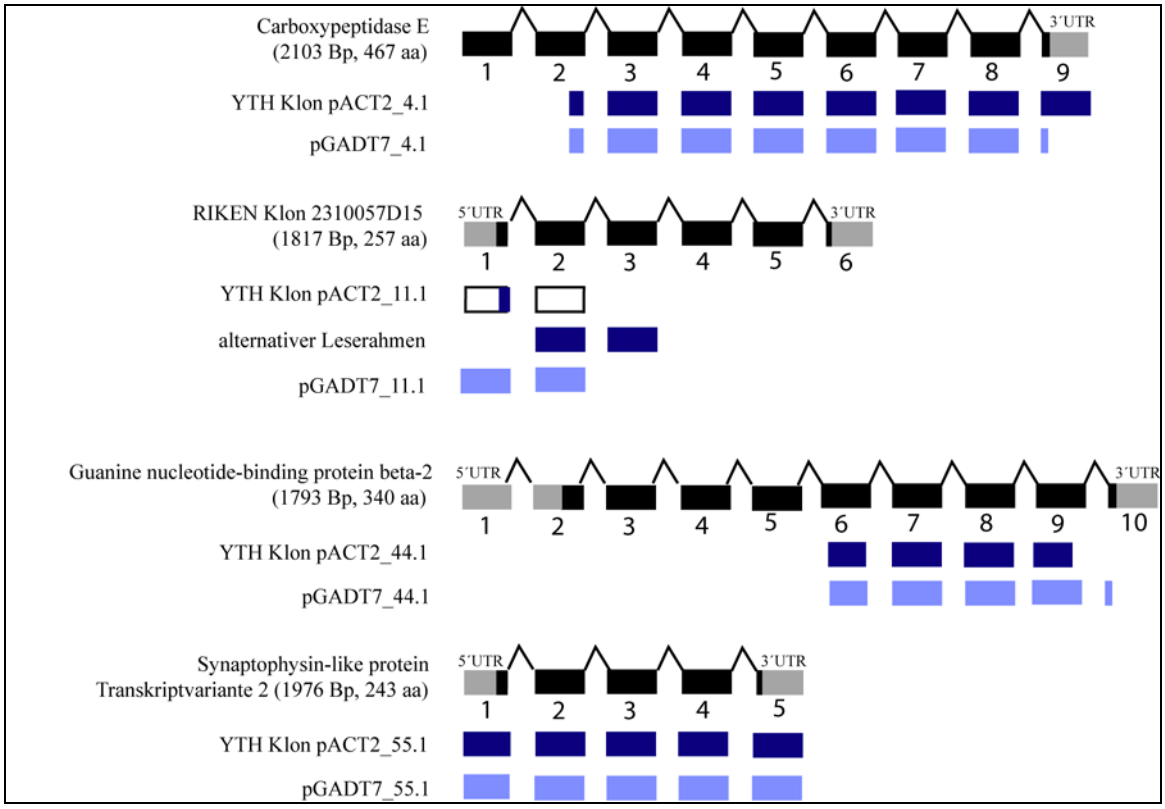


Abbildung 4.2-6: Graphische Darstellung der Genstruktur der potentiellen Interaktionspartner.
Dargestellt ist die Exonstruktur (nicht proportional) der Kandidaten der *Yeast two-hybrid*-Suche. Die schwarzen Boxen zeigen die Protein-kodierende Sequenz. Darunter befindet sich im Vergleich die übereinstimmende Proteinsequenz der *Yeast two-hybrid*-Klone (dunkelblaue Boxen). Die Sequenzabschnitte, die in den Vektor pGADT7 kloniert wurden und mit denen der der GST-*pull-down* durchgeführt wurde sind in hellblau dargestellt. Bei Klon 11.1 entspricht der korrekte Leserahmen des Vektors pACT2 einem kurzen Abschnitt von Exon 1 des RIKEN Klons, der alternative Leserahmen entspricht Exon 2 und 3. Für den GST-*pull-down* wurde der Leserahmen des pACT2 verwendet.

Anschließend wurden die Proteine in einem Transkriptions-/Translationsansatz in Retikulozyten *in vitro* exprimiert und mit [^{35}S]-Methionin radioaktiv markiert. Für die jeweiligen Proteine zeigt sich eine deutliche Bande in der erwartenden Größe: Carboxpeptidase E [40 kDa], Riken Klon 2310017D15 [11 kDa], *Guanine Nucleotide binding protein* [31 kDa] und *Synaptophysin-like protein* [29 kDa] (Abbildung 4.2-7). Das Auftreten multipler Banden in den unterschiedlichen Ansätzen kann durch die Proteolyse der Translationsansätze oder mit der Translation alternativer Methionin-initiierter Produkte erklärt werden.

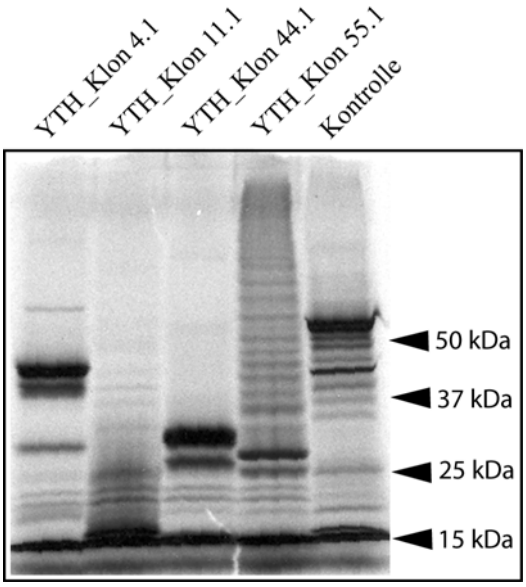


Abbildung 4.2-7: *In vitro* Translation der potentiellen Interaktionspartner.
Die YTH-Klone wurden mit dem "TNT® Quick Coupled Transcription/Translation system" (Promega) *in vitro* unter Einbau radioaktiven [^{35}S]-Methionins translatiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dargestellt sind die Produkte der YTH-Klone 4.1 (Carboxypetidase E), 11.1 (Riken Klon 2310017D15), 44.1 (*Guanine Nucleotide binding* Protein, γ subunit), 55.1 (*Synaptophysin-like* Protein) und der Kontrolle (Luciferase Kontroll-DNA, Promega). Die stärker hervortretenden Banden entsprechen der erwartenden Größe des Proteins.
Die schwarzen Pfeile geben die Größe in KDa an.

Die radioaktiv markierten Ansätze wurden mit Glutathion-Sepharose inkubiert, die entweder GST oder das GST-Fusionsprotein gebunden hat (Abbildung 4.2-8A). Als zusätzliche Kontrolle wurde Sepharose, die nicht mit Proteinextrakten inkubiert wurde, verwendet. In den Eluaten dieser Ansätze sollten sich dann nur die Proteine befinden, die zuvor an die C-terminale Domäne des CRH-R2 gebunden haben. Carboxypeptidase E, der RIKEN Klon 2310017D15 und das *Guanine nucleotide binding protein beta*-2 zeigen eine Bande in der entsprechenden Größe (Abbildung 4.2-8B). Diese vier Kandidaten interagierten spezifisch mit GST_cy2. Eine Interaktion mit den Negativkontrollen konnte nicht beobachtet werden. Diese Proteine konnten somit als Interaktionspartner mit der C-terminalen Domäne des CRH-R2 verifiziert werden. Bei Sypl ist eine relativ schwache Bande zu erkennen. Betrachtet man die Abbildung 4.2-7, so erkennt man hier, dass das Translationsprodukt im Vergleich zu den anderen ein eher schwaches Signal zeigt, so dass dies möglicherweise in einer schlechteren Translationseffizienz dieses Fusionsproteins begründet werden kann.

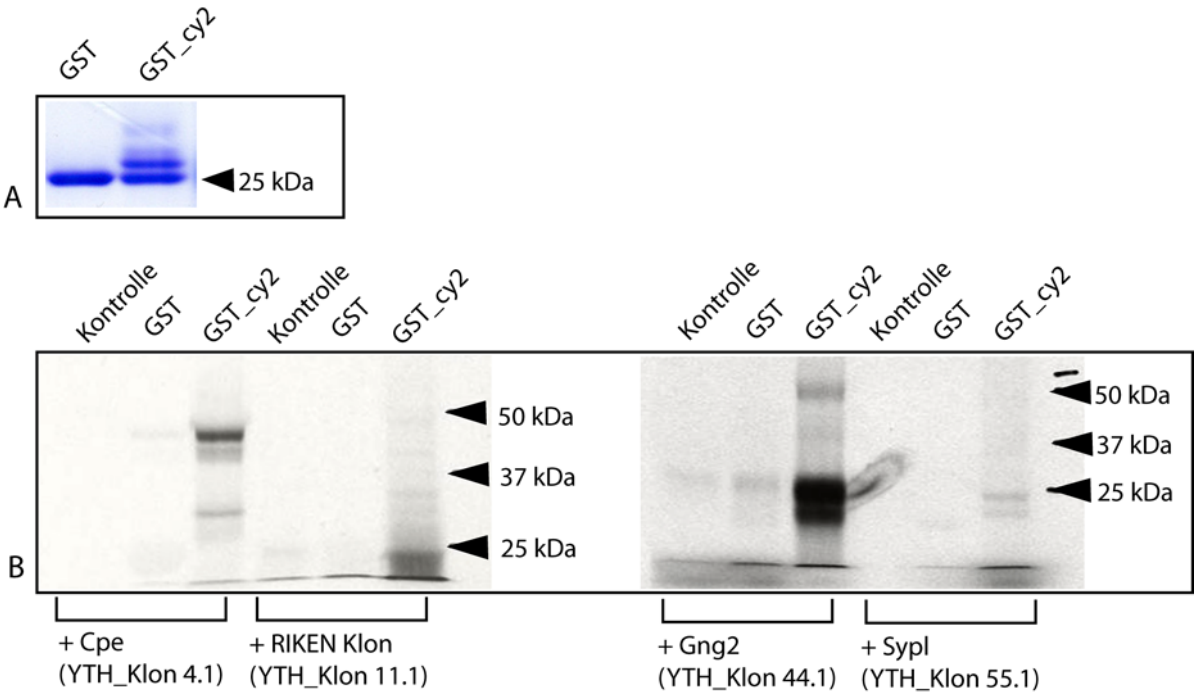


Abbildung 4.2-8: GST-*pull-down*
A. Proteinextrakte von GST und GST_cy2 Fusionsprotein aus Bakterienlysaten, die an Sepharosekügelchen gebunden für den GST-*pull-down* eingesetzt wurden. **B.** *In vitro* translatierte und mit [^{35}S]-Methionin-markierte Proteine wurden 2 Stunden bei 4°C mit Sepharosekügelchen inkubiert, die GST_cy2-Fusionsproteine oder als Kontrolle native GST-Proteine bzw. keine Proteine gebunden haben. Nach Eluation und Waschen wurden diese Ansätze mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Autoradiographie visualisiert. Es kann gezeigt werden, dass die YTH-Klone 4.1, 11.1, 44.1 und 55.1 mit der C-terminalen Domäne des CRH-R2 als GST-Fusionsprotein *in vitro* interagieren.

Wir konnten hier mit dem GST-*pull-down* die Interaktion der C-terminalen Domäne des CRH-R2 mit den *in vitro* exprimierten Proteinen Carboxpeptidase E, RIKEN Klon 2310017D15, *Guanine Nucleotide binding protein* und *Synaptophysin-like protein* die Ergebnisse der *Yeast two-hybrid*-Suche bestätigen.

5 Diskussion

5.1 Regionen-spezifische Genexpressionsanalyse der CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutanten mittels der *Microarray*-Technologie

Die Generierung konventioneller und konditionaler CRH-R1 Knockout-Mäuse hat wesentlich dazu beigetragen, die physiologische und pathologische Rolle des CRH- und CRH-R-Systems aufzuklären. Zahlreiche Studien haben diese Mauslinien unter neuroendokrinologischen und verhaltensspezifischen Aspekten betrachtet. Dennoch sind unsere Kenntnisse über die molekularen Grundlagen, die diesen neuroendokrinologischen und den verhaltenstypischen Merkmalen zugrunde liegen, eher limitiert. Daher war es Ziel dieser Arbeit, das Genexpressionsprofil dieser Mausmutanten mit Wildtyp-Mäusen zu vergleichen, um Kandidatengene zu identifizieren, deren Expression durch den CRH-Rezeptor 1 reguliert wird. Unter Verwendung der *Microarray*-Technologie haben wir die Genexpression des Hippokampus und der Hypophyse der CRH-R1$^{-/-}$ Mutanten und des Hippokampus, der Amygdala und der Hypophyse der konditionalen Knockout-Mäuse analysiert. Mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes wollten wir auch die Frage verfolgen, ob in den verschiedenen Regionen möglicherweise unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden.

5.1.1 Funktionelle Charakterisierung der differentiell exprimierten Kandidatengene in den CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutanten

Mit dem cDNA-*Microarray* haben wir das Genexpressionsprofil von etwa 12.000 Genen analysiert und bei insgesamt 564 Genen eine signifikante Veränderung festgestellt, die unseren Kriterien entsprach. Wir konnten zeigen, dass bei den CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutanten die Expression von 50 Genen im Hippokampus und 89 Genen in der Hypophyse signifikant verändert war. Bei den Mausmutanten, bei denen der CRH-R1 konditional deletiert wurde, waren im Hippokampus 75 Gene, in der Amygdala 303 Gene und im Hypothalamus 47 Gene signifikant differentiell expremiert. Der Expressionsunterschied lag bei 26 % der Gene bei 1,5-fach und mehr. Die Expressionsunterschiede konnten bei insgesamt 18 Kandidaten mit quantitativer RT-PCR erfolgreich validiert werden.

Die Gene, deren Expression durch die Abwesenheit des CRH-R1 Rezeptors verändert wurde, gehören vielen verschiedenen Funktionsklassen an. Vorwiegend konnten sie den Klassen Transport, Metabolismus und Transkription/Translation zugeordnet werden.

Eine interessante Beobachtung ist, dass ein Vielzahl der regulierten Kandidatengene Calciumionen-bindende Eigenschaften besitzen. Calcium-abhängige Signalmechanismen konnten mit bipolaren Störungen in Verbindung gebracht werden und erhöhte Calcium-Konzentrationen können zu psychischen Störungen führen (Berridge 1994; Bezchlibnyk und Young, et al. 2002). Möglicherweise stellen diese Gene potentielle Kandidaten dar, die abhängig von der CRH-R1-Aktivierung, in intrazelluläre Signalmechanismen involviert sind und den verhaltensspezifischen Phänotyp der Mausmutanten bedingen.

Außerdem konnten wir überraschenderweise beobachten, dass einige der Genkandidaten im Immunssystem eine Rolle spielen. Für diese Kandidaten sind bisher keine Zusammenhänge mit CRH-Rezeptor-abhängigen Signaltransduktionsmechanismen beschrieben wurden. Es ist allerdings bekannt, dass immunkompetente Microglia-Zellen im Gehirn viele Eigenschaften von Monocyten des Immunsystems besitzen. Außerdem werden diese diese Zellen durch neuronale Aktivität beeinflusst (Färber und Kettenmann, 2005). Es ist daher möglich, dass der CRH-R1 die Genexpression von Genen in diesen immunkompetenten Zell beeinflusst. Es müsste hier untersucht werden, ob die Gene, die in den CRH-R1 Mausmutanten reguliert wurden und mit dem Immunsystem in Verbindung gebracht werden können auch in diesen Microglia-Zellen exprimiert werden.

Abbildung 5.1-1 zeigt, dass die Kandidatengene auf zellulärer Ebene in sehr verschiedene Prozesse involviert sind. Betrachtet man die vielfältigen Funktionen CRH-abhängiger Prozesse, so ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Die Mehrzahl dieser Kandidatengene konnten bisher nicht direkt mit CRH-abhängigen Signaltransduktionsprozessen in Zusammenhang gebracht werden und stellen daher möglicherweise neue Zielmoleküle dar, die durch Aktivierung des CRH-R1 reguliert werden.

Im Folgenden sollen hier hauptsächlich die Kandidaten näher charakterisiert und besprochen werden, deren differentielle Expression erfolgreich mit quantitativer RT-PCR bestätigt werden konnte.

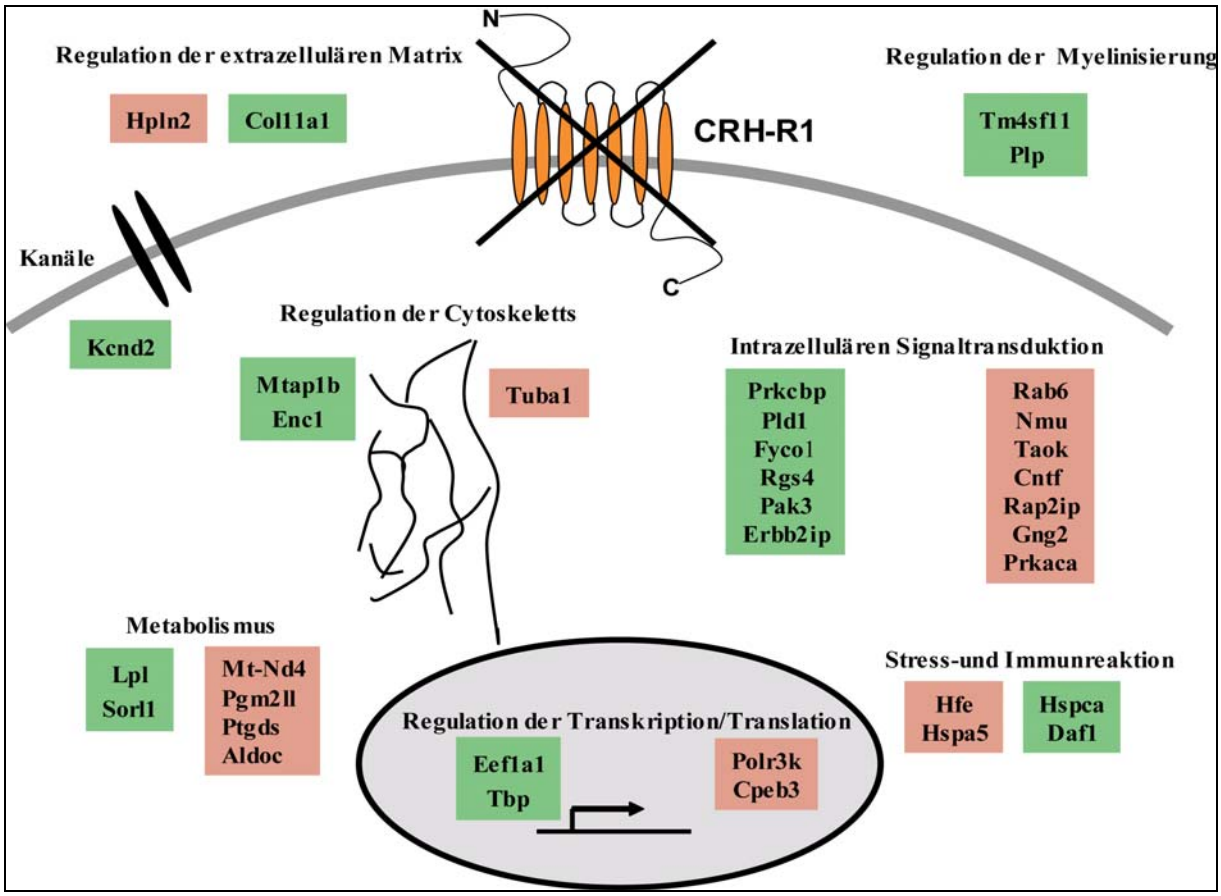


Abbildung 5.1-1: Schematische Darstellung der differentiell exprinierten Kandidatengene und deren Funktionen.
Die Gene, deren Expression durch die CRH-R1-Deletion in den verschiedenen Hirnregionen und der Hypophyse der CRH-R1 Mausmutanten verändert wurde, spielen bei verschiedenen intrazellulären und extrazellulären Prozessen eine Rolle. Berücksichtigt wurden in dieser Übersicht die statistisch signifikant regulierten Kandidatengene, die in den Tabellen 4.1-5 A-E aufgeführt sind. Grün unterlegt bedeutet heraufreguliert. Rot unterlegt bedeutet herunterreguliert.

5.1.1.1 Differentiell exprimierte Gene im Hippokampus der CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutanten

Bei der Analyse der differentiellen Genexpression des Hippokampus der konventionellen CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutanten wurden zwei Gene identifiziert, die bei intrazellulären Signalkaskaden eine Rolle spielen.

Einer der Kandidaten, **Rap2** ***interacting protein*** (Rap2ip), wird im Gehirn, in Zellen neuroendokrinen Ursprungs und in den β-Zellen der Pankreas exprimiert. Es besitzt eine RUN Domäne [(nach RPIP8 (Rap2 interacting protein 8), UNC-14 und NESCA (new molecule containing SH3 at the carboxyl-terminus)], die möglicherweise als spezifischer Effektor auf Proteine der Ras-Superfamilie wirken kann (Callebaut et al., 2001). Rap2ip wurde als Interaktionspartner der GTP-gebundenen Form von Rap2 identifiziert. Diese Interaktion wird über die RUN-Domäne von Rap2ip vermittelt (Janoueix-Lerosey et al., 1998). Rap2 ist ein Mitglied der Ras Superfamilie der GTPasen und zeigt eine 60 % ige Homologie mit Rap1 auf,

welches bei der CRH-abhängigen Aktivierung der ERK-Signalkaskade eine Rolle spielt. Da Rap2 die gleichen Effektormoleküle besitzt wie Rap1, kann man vermuten, dass es auch in ähnliche Signalkaskaden involviert ist (Ohba et al., 2000; Kovalovsky et al., 2002). Eine aktuelle Studie stellt dar, dass Rap2 über eine Aktivierung der c-Jun NH2-terminal kinase (JNK, Mitglied der Familie der MAP Kinasen) die Aktivität von hippokampalen CA1 Neuronen beeinflusst (Zuh et al., 2005).

FYVE *and coiled-coil domain containing 1* (Fyco1), welches im Hippokampus der konventionellen Mausmutante relativ stark heraufreguliert ist, besitzt drei bekannte Proteindomänen: die RUN Domäne, wie auch Rap2ip, die GOLD (GOLGI *Dynamics*) Domäne und eine FYVE (Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1, EEA1) Zinkfingerdomäne. GOLD Domänen konnten bei Proteinen des Golgi-Apparats identifiziert werden und spielen außerdem eine Rolle bei der Interaktion mit verschiedenen Proteinen des Cytoskeletts. Die FYVE Zinkfingerdomäne ist eine Cystein-reiche Domäne, welche zwei Zinkionen binden kann und kürzlich als Interaktionsdomäne von Phosphatidylinositol-3 Phosphaten (PI(3)P) identifiziert wurde. Proteine, die diese Domäne besitzen wurden im Zusammenhang mit Vesikeltransport, Signaltransduktion und Regulation des Aktin-Cytoskeletts beschrieben (Gillooly et al., 2001). Über die spezifische Funktion von Fyco1 ist bis heute noch nichts bekannt. Es ist anzunehmen, dass dieses Gen aufgrund seiner Domänenstruktur in eine Vielzahl intrazellulärer Signalmechanismen involviert ist.

Die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse des Hippokampus der konventionellen CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutanten demonstrieren außerdem, dass die Expression von zwei Genen induziert wurde, die in Myelinisierungsprozesse involviert sind.

Transmembrane 4 subfamily 11 (Tm4sf11, neue Bezeichnung: *Plasmamembrane proteolipid*, Pllp) wird in myelinisierenden Oligodendrocyten im zentralen Nervensystem exprimiert (Gillen et al., 1996). Neuronale Expression konnte auch in Neuronen des Neocortex und Hippokampus des adulten Gehirns beobachtet werden, weshalb angenommen wird, dass dieses Protein möglicherweise neben der Myelinbiogenese auch andere Funktionen besitzt (Bosse et al., 2003).

Der andere Kandidat, **Proteolipid Protein** (Plp), kodiert für das häufigste Protein der Myelinstruktur des zentralen Nervensystems. Dort ist es vorwiegend in Oligodendrocyten exprimiert, konnte aber auch in bestimmten Neuronentypen detektiert werden (Bongarzone et al., 1999). Die Funktion von Plp wurde an verschiedenen Mausmodellen studiert. Spontane Mutationen im Plp-Gen bei Mäusen und Ratten führen zu schwerwiegenden neurologischen Störungen und zu einer stark reduzierten Zahl von reifen Oligodendrocyten. Es wurden

außerdem transgene Mäuse, die zusätzliche Kopien des Plp-Gens tragen und Plp Knockout-Mäuse generiert (Wight und Dobretsova, 2004). Bei Plp Nullmutanten konnte das Anschwellen von Axonen und Demyelinsierung beobachtet werden, was darauf hinweist, dass Plp bei der Interaktion von Axonen und Oligodendrocyten eine Rolle spielt (Boison et al., 1995; Griffiths et al., 1998; Yool et al., 2001). Es hat sich gezeigt, dass die Überexpression des nativen Gens für Oligodendrocyten durch die intrazelluläre Akkumulation weitaus schädigender ist als die Abwesenheit des Proteins (Gow et al., 1998).

Veränderungen in der Expression von Genen, die für strukturelle Komponenten des Myelins kodieren, konnten bereits bei Patienten mit depressiven Störungen und in CRH-überexprimierenden Mausmutanten beobachtet werden (Aston et al., 2004; Peeters et el., 2004). So konnte gezeigt werden, dass Plp, Pllp und Enpp2 im temporalen Kortex dieser Patienten herabreguliert wurden. Allgemein wird angenommen, dass Störungen der Myelinisierungsprozesse synaptische Funktionen beeinträchtigen und für die atrophischen Veränderungen im präfrontalen Kortex und der Amygdala verantwortlich sein könnten, die bei depressiven Patienten beobachtet werden konnten (Drevets et al., 1997; Rajkowska et al., 1999; Sheline et al., 1998). In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass in den Hippokampi beider Mausmutanten ***Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2*** (Enpp2) herunterreguliert war, was bisher aber nicht mit einer unabhängigen Methode untersucht wurde. Enpp2 ist für die Formation von Myelin bedeutend, indem es möglicherweise zur aktiven Myelinisierung oder bei späteren Stadien der Oligodendrocytendifferenzierung beiträgt (Fuss et al., 1997). Eine Veränderung der Transkription konnte bereits bei Patienten mit depressiven Störungen und im Hippokampus und der Amygdala von Mäusen nach Angstkonditionierung beobachtet werden (Mei et al., 2005). Ein weiteres für die Myelinstruktur entscheidendes Gen ist das *Myelin basic protein*. Auch dieser Kandidat ist im Hippokampus und Amygdala der konditionalen Mausmutanten reguliert. Die Veränderung der Expression wurde aber bisher nicht verifiziert.

Diese Ergebnisse legen nahe, die Myelinstrukturen der CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutanten näher zu untersuchen, da diese die Ursache für generelle neuronale Störungen sein könnten und möglicherweise auch zu den veränderten Verhaltensmustern beitragen könnten. Zunächst könnte man auf Proteinebene mit Hilfe quantitativer Western Blots, die Expression bestimmter Proteinmarker der Myelinstruktur, wie z.B. PLP und MBP, untersuchen. Desweiteren könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen Aufschluss über den Zustand der Myelinscheide der CRH-R1 Mausmutanten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen liefern.

Es konnte außerdem die differentielle Expression von **Transthyretin** (Ttr) im Hippokampus in beiden Mauslinien gezeigt werden. Ttr bindet Thyroxin (T4) und Vitamin A (Retinol) in der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) und im Plasma (Hagen and Elliot 1973). Mehrere Studien beschreiben den Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf Verhalten und ihre Rolle bei affektiven Störungen (Bauer et al., 2001; 2002). Umstritten ist allerdings, ob Ttr beim Transport dieser Schilddrüsenhormone vom Blut ins Gehirn über die Plexus Choroidei -CSF Barriere eine Rolle spielt. Erhöhte Ttr Werte konnten in Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen beobachtet werden (Sullivan et al., 1999). Ttr Knockout-Mäuse zeigen eine verstärkte Reaktion auf Stress und erhöhtes Angst-ähnliches Verhalten (Sousa et al., 2004). Da die Abwesenheit von Ttr die Verteilung von Thyroidhormonen im Gehirn nicht beeinflusst, wird vermutet, dass Ttr neben Thyroxin und Retinol noch andere Liganden besitzt und dass diese Interaktionen für verhaltensspezifische Funktionen von Ttr relevant sind (Palha et al. 2000, 2002).

Es ist bekannt, dass Stress die Aktivität der Thyroidhormon-Achse beeinflusst und CRH möglicherweise zur akuten stress-induzierten Inhibition der Thyroid-Achse beiträgt (Chrousos, 1998). Ein direkter Zusammenhang von CRH-abhängigen Mechanismen und Transthyretin konnte bisher aber nicht gezeigt werden. Es sollte hier erwähnt werden, dass Ttr im Hippokampus selbst nicht exprimiert wird, sondern nur im Plexus Choroidei synthetisiert wird (Dickson et al., 1986). Expressionsunterschiede können daher auch durch eine Kontamination mit dem Gewebe entstanden sein.

Die Abwesenheit des CRH-R1 führt zu einer Reduzierung der Expression der **Prostaglandin-D2 Synthase** (Ptgds oder L-Pgds) im Hippokampus des konventionellen CRH-R1 Knockouts. Ptgds gehört zur Lipocalin Superfamilie der Prostaglandinsynthasen und ist verantwortlich für die Produktion von Pgd2 und den Transport lipophiler Substanzen (Flower, 1996). Ptgds ist stark in den Leptomeningen, Plexus Choroidei und der weißen Substanz exprimiert, weniger im Thalamus, Hirnstamm und Cerebellum und nur gering im cerebralen Kortex, Hippokampus und Striatum. Weitere Studien zeigen außerdem die Expression in Oligodendrocyten, Gliazellen, Astrocyten und perivaskulären Zellen (Urade et al. 1987, 1993; Giacomelli et al., 1996; Beuckmann et al. 2000; Liang et al., 2005). Dexamethason, ein synthetisches Glucocorticoid, verstärkt die Expression von Ptgds und dessen enzymatische Aktivität in neuronalen GT1-7 Zellen (García-Fernández et al. 2000). Es wäre also vorstellbar, dass die Expression in den Mausmutanten durch die veränderten Glucocorticoidwerte reguliert wurde. Es gibt allerdings Hinweise, dass Ptgds in ähnliche physiologische Vorgänge wie CRH involviert ist, da beide Gene für die Regulation des

Schlaf-Wach-Zyklus bedeutsam sind (Urade and Hayaishi 1999). Eine veränderte Expression von Ptgds konnte in der Hypophyse von CRH überexprimierenden Mäusen beobachtet werden, was auf eine mögliche direkte Regulation der Ptgds Expression über CRH-abhängige Mechanismen hindeutet (Altar et al., 2004; Peeters et al., 2004).

Desweiteren konnten wir die differentielle Expression der ***Aldolase C*** (Aldoc) im Hippokampus verifizieren. Aldolasen sind glykolytische Enzyme, die Reaktionen des Glukose- und Fructosemetabolismus katalysieren. Es existieren drei Isoformen, wobei Aldolase C die Hirn-spezifische Isoform ist. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass dieses Gen hauptsächlich in Neuronen expremiert wird (Berardini et al., 1997; Leberhz und Rutter, 1969; Ahn et al., 1994; Walther et al., 1998). Erhöhte Aldolase C Werte konnten in Personen mit Schizophrenie, bipolaren Störungen und unipolaren Depressionen nachgewiesen werden (Wilson et al., 1980). Eine aktuelle Studie zeigt, dass Aldoc die Stabilität der *Light Neurofilament* (NF-L)-mRNA reguliert, und dass diese Interaktion möglicherweise für die asymmetrische Form und Funktion von Neuronen wichtig ist (Canete-Soler et al., 2005). Eine Herabregulierung der Aldolase, die hier gezeigt wurde, könnte Störungen neuronaler Funktionen zur Folge haben. Ein möglicher Zusammenhang der Aldolasen Expression mit CRH-abhängigen Mechanismen konnte bislang nicht geklärt werden.

5.1.1.2 Differentiell exprimierte Gene in der Hypophyse der CRH-R1$^{-/-}$ Mausmutanten

In der Hypophyse der konventionellen CRH-R1-/- Mausmutanten war die Expression von 89 Genen verändert, die Unterschiede in der Regulation waren jedoch eher gering. So konnten wir die differentielle Expression von nur 2 Genen mit qRT-PCR verifizieren: Nicotinamide 5´-Mononukleotid Adenylyltransferase 2 (Nmnat-2) und *Regulator of G-protein signaling 4* (Rgs4).

Nicotinamide 5´-mononucleotide adenylyltransferasen (Nmnat) katalysieren den Transfer der Adenylyl-Gruppe von ATP zu NMN (Nikotinsäuremononukleotid), um NAD^+ (Nikotinsäureadenindinukleotid) zu bilden und sind daher eine entscheidende Komponente der NAD-Biosynthese (Hughes et al., 1983). Es hat sich gezeigt, dass NAD^+ für das Überleben von Zellen bei DNA Schäden oder oxidativen Stress wichtig ist.

Regulator of G-protein signaling 4 (Rgs4) reguliert G-Protein-abhängige Signalmechanismen, indem es mit seiner RGS-Domäne als GTPase aktivierendes Protein die Aktivität der Gα-Untereinheit von G-Proteinen reguliert. Ein möglicher Zusammenhang mit CRH-abhängigen Signalmechanismen in der Hypophyse könnte sich daher ergeben, dass bereits gezeigt werden konnte, dass Corticosterone und chronischer Stress die Expression von

Rgs4 im PVN und in der Hypophyse reduzieren (Ni et al., 1999). Auch wir konnten beobachten, dass die Expression von Rgs4 in AtT-20 Zellen nach CRH-Behandlung herunterreguliert wurde (Daten nicht gezeigt). Peeters et al. konnten zeigen, dass Rgs2, ein anderes Mitglied der Familie der Rgs-Proteine, in AtT-20 Zellen nach CRH-Behandlung reguliert wird (Peeters et al., 2004).

Möglicherweise repräsentieren Rgs-Proteine, im speziellen Rgs4, eine Gruppe von Molekülen, die über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Aktivität von CRH-Rezeptoren regulieren. Es bietet sich daher an, diese Signalmechanismen anhand von AtT-20 Zellen näher zu studieren, indem man zum Beispiel die Aktivität von Rgs4 spezifisch inhibiert und mögliche Veränderungen der CRH-abhängigen Phosphorylierung von Signaltransduktionsmolekülen wie den ERKs untersucht.

Unter den Kandidaten, die in der Hypophyse differentiell exprimiert wurden, befinden sich weitere Gene, die mit qRT-PCR nicht verifiziert werden konnten, wie Pak3, Prkaca, Erbb2ip, die aber im Hinblick auf CRH-abhängige intrazelluläre Signalkaskaden sicherlich interessant sind. Pak3 gehört zur Familie der *p21-activated* Kinasen (Paks) und reguliert über eine Aktivierung der MAPK-Kaskade Aktin- und Tubulinfunktionen (Hofmann et al., 2004). Für Erbb2ip (Erbb2 *interacting protein*) konnte gezeigt werden, dass es die Aktivierung von ERK inhibiert indem es bei Bindung von Raf-1 zu aktiviertem Ras interferiert (Kolch, 2003).

5.1.1.3 Differentiell exprimierte Gene im Hippokampus und in der Amygdala der CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamkIIα-Cre Mausmutanten

Die Analyse des Genexpressionsprofils des Hippokampus ergab die differentielle Expression von zwei Genen, die wahrscheinlich bei synaptischen Signalprozessen eine Rolle spielen.

Einer dieser Kandidaten ist **Calsyntenin-3** (Clstn3). Calsyntenine sind Komponenten der postsynaptischen Membran, und es wird vermutet, dass sie an synaptischen Signalprozessen beteiligt sind (Hintsch, et al. 2000). Außerdem besitzen sie Calcium-bindende Eigenschaften. Hier könnte eine Verbindung zu CRH-abhängigen Signalprozessen bestehen, welche die intrazelluläre Calciumkonzentration regulieren (Tse und Lee, 2000). Hintsch et al. konnten außerdem zeigen, dass Clstn-3 spezifisch in den pyramidalen Neuronen der CA2-CA3 Region des Hippokampus exprimiert wird. Interessant ist hier, dass auch der CRH-R1 in der Postsynapse dieser Neuronen lokalisiert ist (Chen et al., 2004; Chalmers et al., 1995; Chen et al., 2000; Van Pett et al., 2000).

Auch ***Cytoplasmatic polyadenylation element binding protein 3*** (Cpeb3), welches im Hippokampus der CRH-R1$^{loxP/loxP}$CamkIIα-Cre Mutanten schwächer exprimiert wurde, ist in

den Pyramidalzellen der CA1 und CA3 Region exprimiert. Diese Proteine besitzen Erkennungsstellen für Proteinkinase A (PKA) und *Calmodulin kinase* II (CamKII) und ihre Aktivität wird möglicherweise durch PKA reguliert. Aktuelle Studien implizieren, dass Cpeb Proteine lokale Proteinsynthese und synaptische Plastizität regulieren (Theis et al., 2003). Es ist bekannt, dass CRH PKA-abhängige Signalkaskaden aktiviert und man kann annehmen, dass die Abwesenheit des Rezeptors zu einer Veränderung PKA-abhängiger Signalkaskaden führt.

Im Hippokampus und in der Amygdala der konditionalen CRH-R1 Mausmutanten konnten außerdem übereinstimmend die differentielle Expression von Oxr1, Sorl1 und dem RIKEN Klon 2610042L04 verifiziert werden.

Sortilin-related receptor (Sorl1) wurde aufgrund seiner Proteindomänenstruktur als Mitglied der Familie der *Vacuolar protein sorting 10 protein (Vps10p)1 domain* Rezeptoren und der *Low density lipoprotein* Rezeptoren (LDLR) identifiziert. Immunhistochemische Untersuchungen und *in situ* Hybridisierungen haben gezeigt, dass Sorl1 in den Neuronen der Pyramidalschicht des Hippokampus, im Gyrus Dentatus, dem cerebralen Kortex und der Purkinje-Zellschicht des Cerebellums exprimiert wird (Motoi et al., 1999; Kanaki et al., 1998). Der Rezeptor bindet verschiedene Liganden, vermittelt Endocytose und die Sortierung von Proteinen (Jacobsen et al., 2003). Scherzer und Kollegen zeigen außerdem, dass in Gehirnen von Patienten mit der Alzheimerschen Krankheit, die Expression dieses Rezeptors deutlich reduziert ist (Scherzer et al., 2004). Der Grund dafür ist bisher nicht bekannt, es wird aber vermutet, dass seine Funktion bei der Cholesterolaufnahme eine Rolle spielen könnte. In degenerierenden Synapsen ist der Bedarf an Cholesterol reduziert, was die Expression des Rezeptors herabregulieren könnte. Auch CRH wurde in Zusammenhang mit der Alzheimerschen Krankheit beschrieben (Mouradian et al., 1986; May et al., 1987; Davis et al., 1999). Die neuroprotektiven Eigenschaften von CRH beeinflussen molekulare Prozesse, die der Alzheimerschen Krankheit unterliegen, und Störungen des CRH-System konnten mit dem Fortschreiten der Krankheit assoziiert werden (Bayatti und Behl, 2005).

Die ***Oxidation resistance 1*** (Oxr1) Genfamilie repräsentiert eine Gruppe von konservierten eukaryotischen Genen. Das Maushomolog von Oxr1, auch C7, wurde 2001 von Fischer et al. identifiziert (2001). Über die Funktion dieses Gens in der Maus ist bisher nicht viel bekannt, außer dass es wahrscheinlich beim Zellmembrankatabolismus eine Rolle spielt. Beim Menschen und der Hefe konnte gezeigt werden, dass dieses Gen bei oxidativem Stress zellprotektive Eigenschaften besitzt, und dass Hitze und oxidativer Stress die Expression induzieren (Volkert et al., 2000). Auch CRH besitzt speziell in Neuronen zellprotektive

Eigenschaften, die abhängig von einer Aktivierung des CRH-R1 sind (Lezoualc'h et al., 2000; Bayatti et al., 2003). Die Transkriptionsmaschinerie, die dieser neuroprotektiven Eigenschaft zugrunde liegt, wurde bisher nicht eingehend untersucht. Es ist lediglich bekannt, dass die PKA/CREB Signalkaskade involviert ist (Bayatti 2005). Möglicherweise repräsentiert Oxr1 ein weiteres Zielgen, welches diese neuroprotektiven Eigenschaften von CRH vermittelt.

5.1.1.4 Differentiell exprimierte Gene im Hypothalamus der konditionalen CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamkIIα-Cre Mausmutanten

Die *Microarray*-Analyse des Hypothalamus der konditionalen CRH-R1 Mausmutanten ergab die differentielle Expression von 47 Genen, von denen bisher keines unabhängig validiert wurde. Der CRH-R1 ist im Hypothalamus der konditionalen Knockout-Mausmutanten nicht deletiert, da der CamKIIα-Promotor hier nicht aktiv ist. Es wurde gezeigt, dass in den konditionalen Mausmutanten die negative Rückkopplungskontrolle der HPA-Achse aufgrund der Deletion des Rezeptors im limbischen System unter Stressbedingungen beeinträchtigt ist (Müller et al., 2003). Unter normalen Bedingungen hemmt das limbische System indirekt über eine Stimulation von inhibitorischen GABAergen Neuronen, welche vom ventrolateralen Septum und dem Bed Nucleus Stria Terminalis (BNST) direkt zu den CRH-Neuronen im hypothalamischen paraventrikulären Nukleus projizieren, die HPA-Achsen-Aktivität (Herman und Cullinan, 1997). Möglicherweise führt aber die chronische Abwesenheit des Rezeptors zu Veränderungen dieser neuronalen Schaltkreise, was sich auch auf zellulärer Ebene im Hypothalamus auswirkt. Interessanterweise konnten wir auch die Herabregulierung von rab6 und oxr1 beobachten, die auch im Hippokampus (Rab6, Oxr1) und Amygdala (Oxr1) dieser Mausmutanten reguliert war. Ein andere Kandidat, dessen Expression im Hypothalamus reprimiert wurde ist *ciliary neurtrophic factor* (Cntf). Cntf induziert Zellproliferation im Hypothalamus (Kokoeva et al., 2005). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob die Zellproliferation im Hypothalamus durch die konditionale CRH-R1-Deletion im beeinträchtigt ist.

Obwohl Validierungsexperiment und weitere Untersuchungen erforderlich sind, stellen die Gene, die hier identifiziert wurden, potentielle Kandidaten dar, die die Aktivität der HPA-Achse mitregulieren.

5.1.1.5 Regulation der Genexpression des RIKEN Klon 2610042L04

Ein Kandidat, dessen Herabregulation im Hippokampus und in der Amygdala der konditionalen Mausmutanten verifiziert werden konnte, ist der RIKEN Klon 2610042L04. Besonders interessant erscheint hier, dass dieses Gen auch in AtT-20 Zellen nach CRH-Behandlung und Stress-abhängig reguliert wird. Die Expression des RIKEN Klons wird durch CRH in AtT-20 Zellen induziert. Bei gestressten Wildtyp-Mäusen wird die Expression reprimiert. Diese Beobachtung ist in Bezug auf eine CRH-R1-abhängige Regulation widersprüchlich, da sowohl Stress als auch CRH denselben Effekt haben sollte. Es muss hier jedoch beachtet werden, dass es sich um drei verschiedene experimentelle Ansätze handelt: CRH-Behandlung von Zellen, chronische Ablation des CRH-R1 in Mäusen und akute Stresserfahrung. Es bedarf hier einer näheren Untersuchung der Mechanismen, die die Expression des RIKEN Klons regulieren. Desweiteren muss auch die Genstruktur genauer analysiert werden.

5.1.2 Die Genexpressionsprofile der Hirnregionen im Vergleich

Eine andere Fragestellung dieser Arbeit behandelt die Veränderung der Genexpression in verschiedenen Regionen der Mausmutanten, da unser Kenntnisstand über die spezifische Funktion des CRH-R1 in speziellen Hirnregionen unzureichend ist.

Vergleicht man die Genexpression des Hippokampus und der Amygdala der konditionalen Mausmutanten miteinander, so gibt es neben Oxr1, dem RIKEN Klon 2610042L04 und Sorl1, die hier verifiziert werden konnten, noch 6 weitere Kandidaten, die in beiden Regionen übereinstimmend reguliert sind. Obwohl in einer aktuellen Studie gezeigt werden konnte, dass die Expressionsprofile von Amygdala und Hippokampus extrem ähnlich sind, ist die geringe Übereinstimmung nicht überraschend (Sandberg er al., 2000). Wie schon diskutiert wurde, beeinflusst auch der Grad der Expression eines Gens die Analyse, so dass der Unterschied in der Expression bei gering exprimierten Genen möglicherweise nicht detektiert werden kann. Da es ja auch langfristig Ziel dieser Analysen ist, gerade die Regionen-spezifischen molekularen Prozesse zu identifizieren, die durch den CRH-R1 reguliert werden, können diese in den Regionen unterschiedlich regulierten Gene, wichtige Hinweise liefern.

Wir wollten außerdem feststellen, ob sich das Genexpressionsprofil des Hippokampus der zwei Mauslinien unterscheidet. Vergleicht man das Expressionsprofil der konventionellen Knockout-Mäuse mit den konditionalen Knockout-Mäusen, so findet man 5 Übereinstimmungen (Ttr, Plp, Rab6, Aldoc, Enpp2). Auch eine "Kreuz-Validierung" ergab

keine weiteren Übereinstimmungen. Das Genexpressionsprofil der Hippokampi unterscheidet sich demnach sehr deutlich. Das kann zum einen technische Ursachen haben oder auf verschiedene genetische Hintergründe der Mauslinien zurückzuführen sein. Generell handelt es sich bei den konventionelle Mausmutanten um eine komplette Inaktivierung, die natürlich andere Konsequenzen zur Folge hat, als eine sehr spezifischen Ablation des Rezeptors in Vorderhirnstrukturen. So besteht bei den konventionellen Mausmutanten eine Glucocorticoidmangel, der möglicherweise Einfluss auf die Genexpression im Hippokampus hat. Diverse Studien konnten bereits zeigen, dass Glucocorticoide die Funktion des Hippokampus beeinflussen und damit auch kognitive und verhaltensspezifische Vorgänge steuern (Tronche et al., 1999; Datson et al., 2001; Korte et al., 2001). Obwohl die Analyse der konditionalen CRH-R1 Knockout-Mäuse zeigt, dass das limbische CRH-System für den verhaltensspezifischen Phänotyp verantwortlich ist, kann man davon ausgehen, dass die Glucocorticoiddefizienz im Hippokampus der konventionellen CRH-R1$^{-/-}$ Knockout-Mäuse Einfluss auf molekulare Prozesse hat.

Um zu untersuchen, welche Gene hier spezifisch über eine Aktivierung des CRH-R1 reguliert werden, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Es wäre zum Beispiel sinnvoll, Zellen mit CRH oder Dexamethason zu stimulieren und die Expression der hier identifizierten Gene zu untersuchen. Hier würden sich zum Beispiel AtT-20 Zellen oder neuronale Zelllinien als Modell anbieten, wobei zunächst die Expression des Kandidatengens in diesen Zelllinien gezeigt werden müsste.

Es muss hier außerdem berücksichtigt werden, dass die Cre/loxP Rekombination und damit die CRH-R1-Deletion etwa in der dritten postnatalen Woche stattfindet, wenn der CamKIIα-Promotor aktiv ist (Tsien et al., 1996; Minichiello et al., 1999). Bei den konventionellen Mausmutanten hingegen ist der Rezeptor bereits embryonal deletiert. Da der CRH-R1 normalerweise im frühen postnatalen Stadium aktiv ist, beeinflusst die Deletion bei den CRH-R1-/- Mausmutanten sicherlich andere molekulare Mechanismen als bei den konditionalen Knockout-Mäusen (Chen et al., 2004).

5.1.3 *Microarray*-Technologie als Methode zur Identifizierung CRH-abhängiger Signalmechanismen?

Es konnte hier gezeigt werden, dass die Deletion des CRH-R1 zur einer deutlichen Veränderung der Genexpression in verschiedenen Hirnregionen und der Hypophyse führt. Der Vorteil der Analyse des Transkriptionsprofils liegt im allgemeinen in der Erfassung von

globalen Veränderungen des Genexpressionsmusters und weniger in der Messbarkeit der Veränderung einzelner Genkandidaten. Mit unseren Daten konnten wir eine Aussage über die Genexpressionsveränderung bestimmter Gengruppen, Signaltransduktionswege oder funktioneller Klassen treffen. Außerdem wurde hier auch die regulierte Expression einzelner spezifischer Gene beschrieben. Ein Zusammenhang mit den bekannten CRH-Rezeptor 1-abhängigen multiplen Signaltransduktionswege ist jedoch zunächst nicht offensichtlich. Auch gibt es kaum Studien, die sich mit Regionen-spezifischen CRH-abhängigen Prozessen auf molekularer Ebene beschäftigen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die CRH-abhängige Aktivierung von ERK1/2 im Hippokampus und in der Amygdala verhaltenspezifische Prozesse induzieren (Refojo et al., 2005). Eine andere Studie beschreibt, dass die Aktivierung des CRH-R1 in der Amygdala zu einem NMDA-Rezeptor- vermittelten Calcium-Einstrom und der Aktivierung der Calcium-Calmodulin-abhhängigen Proteinkinase (CaMKII) Kaskade führt, was in länger anhaltenden verhaltensspezifischen und zellulären Veränderungen resultiert (Rainnie et al., 2004).

Dennoch bietet die Identifizierung neuer Zielmoleküle der CRH-R1 Aktivierung die Möglichkeit, neue Prozesse zu entschlüsseln, bei denen das CRH-System möglicherweise involviert ist. So weisen unsere Daten darauf hin, dass möglicherweise Myelinisierungsprozesse bei den Mausmutanten beeinträchtigt sind. Ein möglicher Einfluss des CRH-Systems auf Myelinisierungsprozesse wurde bisher noch nicht untersucht.

Außerdem konnten wir die CRH-R1-abhängige Regulation von Signalmolekülen wie Rap2ip, Fyco1 und Rgs4 zeigen, die bisher noch nicht im direkten Zusammenhang mit dem CRH-System beschrieben worden sind. Es gibt relativ viele Informationen über allgemeine Signaltransduktionskaskaden, die über die CRH-R1-Aktivität reguliert werden. Es wird jedoch deutlich, dass für die multiplen Funktionen des Rezeptors spezifische Regulierungsmechanismen erforderlich sind. Auch die Regulation von zwei Molekülen, Clstn3 und Cpeb3, die bei synaptischen Prozessen eine Rolle spielen, ist im Zusammenhang mit dem CRH-System interessant.

Gerade die Identifizierung neuer Gene, wie zum Beispiel CRH-R1-aktivierter Signalmoleküle, bietet die Möglichkeit der Entdeckung alternativer Mechanismen, die zu spezifischen Funktionen des Rezeptors beitragen.

Ein funktioneller Zusammenhang dieser Genkandidaten mit CRH-Signalmechanismen muss hier noch gezeigt werden. Es muss beachtet werden, dass die Veränderung der Genexpression durch direkte CRH-R1 Regulierung oder indirekt durch die Veränderung von *upstream* Genen (z.B. Transkriptionsfaktoren) hervorgerufen werden kann. Hier stellt sich dann auch die

Frage, ob die Regulation dieser Gene Ursache oder Konsequenz des verhaltensspezifischen und neuroendokrinologischen Phänotyps der Mausmutanten sind.
Im Gegensatz zu "*Gain of function*"-Methoden, wie z.B. Stimulierung durch CRH, handelt es sich bei den CRH-R1 Mausmutanten um ein "*Loss of Function*"-Modell, was bei der weiteren Analyse der Funktion der Kandidatengene auch in Betracht gezogen werden muß. Desweiteren stellen die CRH-R1 Mausmutanten ein Modell der chronischen Rezeptor-Inaktivierung dar, was nur begrenzt mit einer akuten Rezepter-Inaktivierung oder auch Aktivierung verglichen werden darf. Sicherlich werden langfristig andere molekulare Prozesse an die Abwesenheit des Rezeptors angepasst als es bei einer vorübergehenden Inaktivierung der Fall wäre.

5.1.4 Möglichkeiten und Grenzen der *Microarray*-Technologie

Die *Microarray*-Analyse bietet als schnelle und effiziente Methode den Vorteil der simultanen Genexpressionsanalyse von mehreren Tausend Transkripten. Dennoch ist für eine erfolgreiche Durchführung ein sorgfältiges experimentelles Design erforderlich. Die erfolgreiche Verwendung des MPIP *Microarrays* konnte schon vielfach bestätigt werden.
Die RNA von 5-6 Tieren je Gruppe wurde vereinigt, was die Unterschiede, die auf individuelle Variabilität beruhen, verringert und damit die statistische Leistung des Experiments verstärkt (Peng et al., 2003). Auch die technische Durchführung erfolgte stringent, indem für jedes Experiment 10 Arrays (10 technische Replikate, je 5 *Arrays* Cy3 und Cy5 markiert) verwendet wurden.
Die Durchführung einer *Microarray*-Analyse erfordert die Verifizierung der Daten mit unabhängigen Methoden. Quantitative *real-time* PCR ist dabei häufig die Methode der Wahl und konnte bei zahlreichen Studien erfolgreich für die Validierung von *Microarray*-Daten verwendet werden (Chuaqui et al., 2001; Rajeevan et al 2001., Walker 2002; Zhao et al., 2001). Die Ergebnisse zeigen, dass bei insgesamt 50 % der Kandidaten aus allen Experimenten die Verifizierung erfolgreich war.
Neben der vielen Vorteile der *Microarray*-Technologie gibt es auch eine Zahl von Nachteilen. Zunächst werden bei der Analyse nur die Gene berücksichtigt, deren cDNA auf dem *Array* präsent sind. In diesem Fall waren das 17.000 cDNAs, die insgesamt ca. 12.000 verschiedene Gene repräsentieren. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass im Hippokampus ca. 50.000-60.000 Transkripte exprimiert werden (Evans et al., 2002; Datson et al., 2001). Daher wird

deutlich, dass dieser *Microarray* wahrscheinlich längst nicht die Gesamtheit der Transkripte umfasst.

Das Expressionsprofil berücksichtigt außerdem eher die Gene, die stärker exprimiert werden. Gene, die sehr schwach exprimiert werden, und zeitlich und räumlich restriktiv exprimierte Gene, werden hier eher nicht berücksichtigt. Das ist insofern ein Nachteil, als dass schon relativ geringe Veränderungen (weniger als 2-fach) der Genexpression von signifikanter Bedeutung für Hirnfunktionen sein können (Nisenbaum, 2000). Neurotransmitter gehören zum Beispiel zu den schwach exprimierten Genen, sind aber von großer Bedeutung für neuronale Funktionen. Oft werden geringe Expressionsunterschiede auch deswegen nicht berücksichtigt, da diese vom Hintergrundrauschen, welches durch die *Array*-Technik bedingt ist, überdeckt werden.

Bei Hirnregionen wie dem Hippokampus und der Amygdala handelt es sich um sehr komplexe Strukturen bestehend aus unterschiedlichen Kernen und neuronalen Zellpopulationen (z.B. Interneurone, Pyramidalneurone) und nicht-neuronalen Zellpopulationen (z.B. Astrocyten, Microgliazellen, Oligodendrocyten). Datson und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das Transkriptom des Hippokampus im Vergleich zu nicht-neuronalen Geweben deutlich komplexer ist (Datson et al., 2001). In der Amygdala, die anatomisch in mindestens 13 unterschiedliche Regionen eingeteilt werden kann, wird die Mehrheit der Gene spezifisch in Subnuklei exprimiert (Pitkänen et al., 1997; Zirlinger et al., 2001). Das beeinflusst die Auswertung insofern, als dass Gene, die spezifisch in Subkernen oder Subpopulationen exprimiert werden, mit dieser Methode wahrscheinlich nicht detektiert werden können. Ein anderes Problem sind Kontaminationen mit angrenzenden Hirnregionen. Als Beispiel wurde hier bereits die Expression von Ttr aufgeführt, welches nur im Plexus Choroidei, welcher an den Hippokampus grenzt, exprimiert wird, nicht aber im Hippokampus selbst. Eine Alternative zur eher groben Dissektion von Hirnregionen, wäre hier die Anwendung der Microdissektion mit einem Laser ("Laser microdissection, LMD"), die es ermöglicht spezifischere Zellpopulationen zu isolieren (Datson et al., 2004; Zirlinger et al., 2003; Kamme et al., 2004).

Die relativ geringen Veränderungen (26 % der Gene +/- 1,5-fach), die wir hier beobachten können, korrespondieren gut mit den Ergebnissen von Studien, die auch hirnregionenspezifische Genexpressionsanalysen durchgeführt haben (Sandberg et al., 2000, Saito et al., 2002; Irwin et al., 2001).

Der cDNA *Microarray*, der hier verwendet wurde, hat gegenüber einem Oligonukleotid-*Array* den Nachteil, dass zwischen Spleißvarianten meistens nicht differenziert werden kann und Hybridisierungen auch mit verwandten Isoformen stattfinden.
Ein weitere möglicher Nachteil ist die RNA-Amplifikation, die für die *Microarray*-Analyse durchgeführt werden musste. Durch unterschiedliche cDNA-Synthese-Effizienz kann die Komplexität der finalen cDNA-Population verringert werden, oder die Konzentration individueller mRNAs verändert werden. Dies wäre ein mögliche Erklärung dafür, dass es uns bei einigen Kandidaten nicht gelungen ist, die Expressionsunterschiede mit der quantitativen *real-time* PCR zu validieren.
Desweiteren muss beachtet werden, dass die *Microarray*-Analyse nur Hinweise auf die Expressionsveränderung der mRNA geben kann, was jedoch nicht zwangsweise mit der Funktion des Genprodukts korreliert. Außerdem werden translationalen und posttranslationalen Modifizierungen von Genprodukten (z.B. Phosphorylierungen) und der eigentliche Proteinumsatz nicht berücksichtigt, welche die Funktion des Gens erheblich beeinflussen können (Luo und Geschwind, 2001). Hier ist es wichtig, die Analyse auf Proteinebene fortzusetzen oder mit anderen Methoden zu vergleichen, die Modifikationen von Proteinen betrachten, wie zum Beispiel mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese kombiniert mit Massenspektrometrie.

5.1.5 Schlussfolgerung

Die genetische Modifikation des CRH-Systems bietet uns die Möglichkeit, die vielfältigen Funktionen, die dieses System auf eine Reihe von physiologischen und verhaltensspezifischen Mechanismen hat, zu untersuchen. Die Deletion des CRH-R1 hat eine profunde Auswirkung auf die Regulation von Verhalten und HPA-Achsen-Aktivität. Die konditionale Deletion des Rezeptors demonstriert, dass besonders seine Aktivität in limbischen System, wie Hippokampus und Amygdala, und anderen Vorderhirnstrukturen, die verhaltensspezifischen Eigenschaften dieser Mausmutanten bewirkt.
Die Erstellung eines Genexpressionsprofils dieser Regionen in dieser Arbeit sollte dazu beitragen, neue Kandidatengene, die durch die Aktivität des Rezeptors reguliert werden, zu identifizieren und damit die molekularen Grundlagen des Phänotyps aufzuklären. Unsere Daten zeigen, dass die Deletionen des Rezeptors bei den Mausmutanten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu deutlichen Unterschieden in der Genexpression geführt haben. Diese Veränderungen konnten wir sowohl im Hippokampus und der Hypophyse der

konventionellen als auch im Hippokampus, der Amygdala und dem Hypothalamus der konditionalen Mausmutanten beobachteten. Wir konnten hier einzelne Kandidaten identifizieren, bei denen der Zusammenhang mit CRH-abhängigen Signalmechanismen bekannt ist, aber auch Kandidaten, die auf bisher unbekannte CRH-Funktionen hindeuten. Diese Genexpressionsdaten bieten eine geeignete Basis für zukünftige Untersuchungen, um die molekulare Wirkungsweise des CRH-Systems zu verstehen.

Langfristiges Ziel ist die Identifizierung der molekularen Komponenten des CRH/CRH-R-Systems, da eine Störung dieses Systems eine der Ursachen oder Begleiterscheinungen von affektiven Störungen beim Menschen ist. Die Modulation der beteiligten Gene und damit ein Eingreifen in die molekularen Signalkaskaden könnte neue Möglichkeiten der Therapie von psychischen Krankheitenbieten.

5.2 Identifizierung und Charakterisierung von CRH-R2 Interaktoren

5.2.1 Identifizierung von Interaktionspartnern der C-terminalen Domäne des CRH-R2 mittels des *Yeast two-hybrid*-Verfahrens

Die CRH-Rezeptoren 1 und 2 sind in ihren cytoplasmatischen Domänen zu 89 % homolog und 76 % der Aminosäuren sind identisch (Abbildung 5.2-1). Eben diese Unterschiede im Carboxyterminus könnten die Grundlage für die Interaktion mit verschiedenen Proteinen sein und damit die unterschiedlichen Funktionen der Rezeptoren definieren. In einer *Yeast two-hybrid*-Suche mit der C-terminalen Domäne des CRH-R1 konnte eine Interaktion mit PSD-95 über eine PDZ-Domäne identifziert werden (Engeholm, 2002; Breu et al., 2005, zur Publikation eingereicht). Die letzten vier Aminosäuren des CRH-Rezeptors 2 lauten im Unterschied zu CRH-R1 "TAAV" und enstprechen damit nicht dem typischen "(S/T)XV"-Konsensusmotiv der PDZ-Domäne. Eine Interaktion von CRH-R2 und PSD-95 konnte daher auch nicht nachgewiesen werden (Engeholm, 2002).

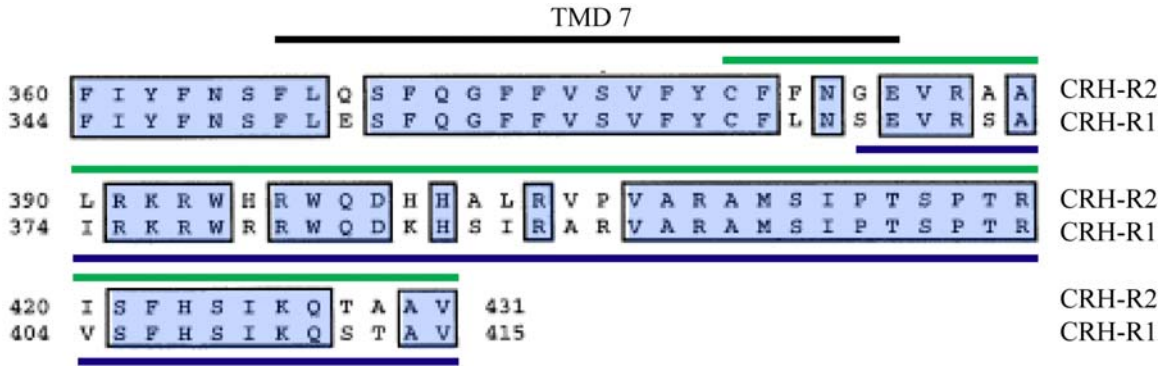


Abbildung 5.2-1: Vergleich der Aminosäuresequenz der C-terminalen Sequenz des CRH-Rezeptors 1 und 2.

Angegeben sind die für die *Yeast two-hybrid*-Suche verwendete Sequenz (CRH-R2, AS 368-415, grüner Balken; CRH-R1, AS 380-431, blauer Balken) und die Lokalisation der 7. Transmembrandomäne (TMD7, schwarzer Balken) (nach Perrin et al., 1995)

Um Proteine zu identifizieren, die mit der C-terminalen Domäne des CRH-R2 Rezeptors interagieren und daher möglicherweise spezifisch CRH-R2-abhängige Signalprozesse weiterleiten, wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine *Yeast two-hybrid*-Suche durchgeführt.

Es wurde eine cDNA Bibliothek aus dem Gehirn der adulten Maus verwendet, um die Interaktoren zu identifizieren, die speziell im zentralen Nervensystem von Bedeutung sind.
In dem primären *Screen* konnten 42 Klone als mögliche Interaktionspartner mit der C-terminalen Domäne des CRH-R2 identifiziert werden (siehe Tabelle 4.2-1). Davon wurde die Interaktion mit 13 verschiedenen Klonen in einem unabhängigen Experiment in der Hefe erneut bestätigt (siehe Tabelle 4.2-2). Interaktionen, die in einem *Yeast two-hybrid*-Suche detektiert wurden, sollten immer mit einer weiteren Methode verifiziert werden, um auszuschließen, dass spezielle Hefeproteine diese Interaktion vermitteln. Wir haben den GST-*pull-down* verwendet, mit dem die Interaktion der C-terminalen Domäne und vier Kandidaten (*Guanine-nucleotid binding protein beta 2*, Gnb2; Carboxypetidase E, Cpe; *Synaptophysin-like protein*, Sypl; RIKEN Klon 2310057D15) bestätigt werden konnte. Im Folgenden wird hier näher auf die Funktion der einzelnen Kandidaten eingegangen, um die physiologische Relevanz der Interaktion mit dem CRH-R2 zu beurteilen.

5.2.2 Funktionelle Charakterisierung der Interaktionspartner

5.2.2.1 Das Guanine-nucleotide binding protein beta 2 (Gnb2)

Gnb2 ghört zur Familie der heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine), welche als Signaltransduktionsmoleküle der G-Protein gekoppelten Rezeptoren dienen. Es gibt drei Untereinheiten, Gα, Gβ und Gγ, von denen wiederum mehrere Isoformen existieren (Cabrera-Vera et al., 2003). In Folge einer Rezeptoraktivierung wird die GTP-gebundene Gα-Untereinheit von der Gβ/Gγ-Untereinheit dissoziiert. In diesem Zustand können die Untereinheiten weitere Effektormoleküle regulieren. Der Gβ/Gγ Komplex bindet und aktiviert Effektormoleküle, u.a. Calcium- und Kaliumionenkanäle, Phospholipase A2, und verschiedene Adenylatzyklasen (Clapham und Neer, 1997). Gnb2 konnte als Mitglied einer Proteinfamilie identifziert werden, die sogenannte WD-Wiederholungsdomänen enthalten (Li und Roberts, 2001). Diese Domänen bestehen aus vier oder mehr sich wiederholenden Einheiten, die einen konservierten Kern von ungefähr 40 Aminosäuren enthalten und gewöhnlicherweise mit Tryptophan und Asparaginsäure (WD) enden. Andere Mitglieder dieser Familie üben Funktionen in verschiedenen Bereichen aus: RNA-Synthese und Prozessierung, Chromatinassemblierung, Vesikeltransport, Cytoskelettassemblierung, Zellzyklusregulation und programmierter Zelltod. Kürzlich konnte Gnb2 als Interaktionspartner von Glucocorticoidrezeptoren identifiziert werden. Diese Interaktion

findet über die Glucocorticoid *response element* (GRE)-Domänen statt und unterdrückt die transkriptionale Aktivität des Rezeptors (Kino et al., 2005).

Es ist bekannt, dass die CRH-R1 Rezeptoren nach Bindung ihrer Liganden, die $G\alpha_s$-Untereinheit stimulieren, die wiederum die cAMP/PKA-Signalkaskade aktiviert. Die 3. intrazelluläre Domäne ist dabei für die G-Protein-Kopplung entscheidend. In den letzten Jahren wurde erkannt, dass viele Mitglieder der Klasse B der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPRCs), wie z.B. die *Parathyroid-Hormone*-Rezeptoren und die Schilddrüsenhormon-stimulierenden Rezeptoren, neben der $G\alpha_s$-Untereinheit auch ander G-Protein-Untereinheiten binden und darüber verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktivieren können (Laugwitz et al. 1996; May and Gay 1997). Das konnte auch für den CRH-R1 gezeigt werden. In einer aktuellen Studie wurde herausgefunden, dass eine bestimmte Region von ungefähr 23 Aminosäuren der C-terminalen Domäne des *Parathyroid-Hormone*-Rezeptoren für die Interaktion mit der Gβ/Gγ Untereinheit verantwortlich ist (Mahon et al., 2005). Sequenzanalysen demonstrieren, dass diese Domäne unter den GPRCs stark konserviert ist (Mahon und Shimada, 2005). In einer funktionellen Analyse dieser Interaktion wurde gezeigt, dass Mutationen in dieser Region zu einer Blockade der PLC- und MAPK-Signalkaskade führt. Wir konnten feststellen, dass die für die Interaktion entscheidenden Aminosäuren, nämlich Arginin (R), Lysin (K) und Tryptophan (W), auch in der C-terminalen Domäne des CRH-R1 und CRH-R2 in sehr ähnlicher Position vorhanden sind (Abbildung 5.2-2).

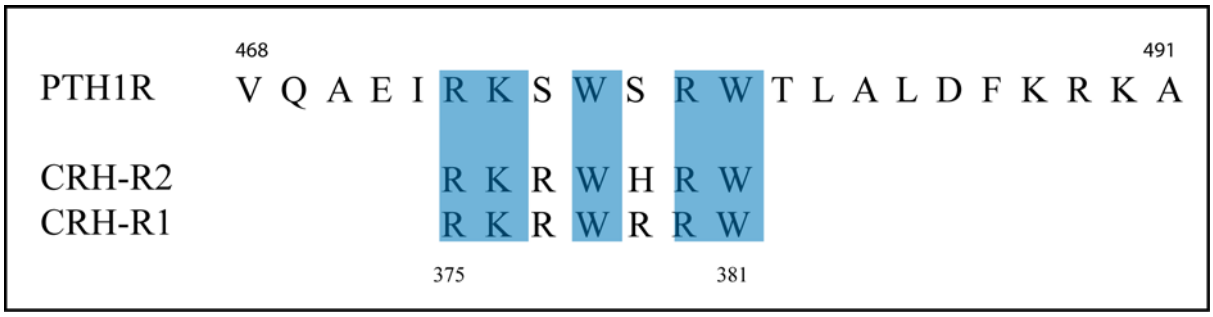


Abbildung 5.2-2: Vergleich der C-terminalen Aminosäurensequenz des *Parathyroid-Hormon*-Rezeptors (PHT1R) mit des CRH-R1 und CRH-R2.
Gezeigt werden Aminosäure 468-491 des PHTR1 und Aminosäure 375-381 der CRH-R. Die homologen Aminosäurereste, die bei der Interaktion des PHTR1 mit der Gβ/Gγ-Untereinheit entscheidend sind, sind blau unterlegt.

Es ist daher naheliegend, dass diese Domäne auch bei den CRH-Rezeptoren eine spezifische Interaktion mit der Gβ/Gγ-Untereinheit vermittelt, zumal in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass der CRH-R2 mit der Gβ-Untereinheit interagiert. Möglicherweise stellt diese

Interaktion einen neuen Mechanismus dar, mit der die CRH-Rezeptoren alternative Signalkasakaden aktivieren. Zunächst müßte überprüft werden, ob Mutationen in dieser Domäne des CRH-R2, sowie des CRH-R1, zu einer Unterbrechung der Interaktion führen und ob diese *in vivo* funktionelle Konsequenzen für die Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle hätte.

5.2.2.2 Synaptophysin-like Protein (Sypl), Pantophysin

Pantophysin gehört neben Synaptophysin, Synaptoporin und Mitsugumin zur Familie der Physine. Neben den Gyrinen und den SCAMPs (*secretory carrier-associated membrane proteins*) stellt die Familie der Physine einen bestimmten Typ integraler Membranproteine von synaptischen Transportvesikeln dar, der durch vier Transmembrandomänen sowie cytoplasmatische N- und C-terminale Regionen charakterisiert ist (Hübner et al., 2002).
Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Physin-Familie, neben den Familien der Gyrine, Occludine und MAL (*Myelin and lymphocyte protein*), eine konservierte Domäne, die MARVEL (*MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link*) Domäne, besitzen. Proteine mit dieser Domäne wurden im Zusammenhang mit einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie der Biogenese von Transportvesikeln beschrieben (Sánchez-Pulido et al., 2002). Die mRNA von *Pantophysin* wurde in neuroendokrinen und nicht-neuroendokrinen Zellen der Maus nachgewiesen. *Pantophysin* konnte in Transportvesikeln detektiert werden und eine Kolokalisation mit verschiedenen Markern intrazellulärer Transportsysteme, wie Transferrin (Marker für das Plasmamembran-Endosom Recycling-System), vSNARE (*vesicular SNAP receptor*) und SCAMPs (Endocytose-Marker), wurde beschrieben (Haass et al., 1996). Die endocytotische Prozessierung des CRH-R2 wurde bisher noch nicht untersucht. Allgemein gilt jedoch für G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, dass die Bindung von Agonisten die Endocytose über einen vesikulären Aufnahmemechanismus stimuliert. Nach der intrazellulären Prozessierung in endosomalen Kompartimenten, werden die Rezeptoren durch Rücktransport zur Membran recycelt oder sie werden in anderen Kompartimenten, wie den Lysosomen, degradiert (Gáborik und Hunyady, 2003). Vorstellbar wäre eine Interaktion des CRH-R2 mit Pantophysin während des intrazellulären Transports zu den Endosomen oder zur Plasmamembran. Eine physiologische Bedeutung dieser Interaktion liegt zunächst nicht auf der Hand, da neben seiner Funktion als Strukturprotein von cytoplasmatischen Vesikeln über Pantophysin wenig bekannt ist. Die Aufklärung intrazellulärer Transportwege des CRH-R2 und die Identifizierung beteiligter Moleküle ist entscheidend für unser Verständnis, wie die Expression des Rezeptors reguliert wird. Um die Konsequenz der Interaktion zu

charakterisieren, müsste zunächst eine Kolokalisation des Rezeptors mit Pantophysin in den Vesikeln gezeigt werden. Das könnte zum Beispiel über subzelluläre Fraktionierung und Immunaufreinigung geschehen.

5.2.2.3 Die Carboxypeptidase E

Die Carboxypeptidase E spielt bei der Biosynthese und der Sortierung von vielen Peptidhormonen und Neurotransmittern eine Rolle. Sekretorische Proteine werden normalerweise von Zellen über den nicht-regulatorischen sekretorischen Weg freigesetzt. In neuroendokrinen Zellen des Nervensystems und des endokrinen Systems hingegen, gibt es auch einen regulierten sekretorischen Weg (regulierte Exocytose, *regulated secretory pathway*, RSP), über den Hormone, Neuropeptide und Granine Calcium-abhängig sezerniert werden. Die größere inaktive Form dieser Peptidhormone und Neuropeptide werden in die Granula des RSP verpackt und in diesen Granula zu aktiven Peptiden prozessiert, wobei auch frühere Prozessierungen im *trans*-Golgi Netzwerk stattfinden können. Das Signalmotiv für die Sortierung wird durch ein Konsensus-Konfirmations-abhängiges Motiv kodiert und konnte als erstes bei Proopiomelanocortin (POMC) identifiziert werden (Cool et al., 1995). CPE existiert in zwei Formen: (1) in einer löslichen, enzymatisch aktiven Form und (2) in einer membran-gebundenen Form mit schwacher enzymatischer Aktivität. Die Membran-gebundene Form dient in sekretorischen Granula als Rezeptor, der Proteine in den RSP sortiert und die lösliche Form weist eine Pro-Hormon-prozessierende Exopeptidase-Aktivität auf (Shen et al. 1997; Cool et al., 1997; Smyth et al., 1989;). In diesen Granula spaltet CPE die basischen Reste von Hormonen und Neuropeptid-Intermediaten, um bioaktive Peptide zu generieren. In seiner Membran-gebundenen Form konnte CPE in chromaffinen Zellen, der Hypophyse, in β-Zellen der Pankreas und in AtT-20 Zellen nachgewiesen werden (Guest et al., 1991; Dhanvantari und Loh, 2000; Hill et al., 1995; Song und Fricker, 1995; Mitra et al., 1994). Eine Spontanmutation der kodierenden Region des *Cpe* Gens in Cpe^{fat}/Cpe^{fat} Mäusen führt zu einer Inaktivierung dieses Enzyms und zur teilweisen Degradierung des CPE Proteins. Diese Cpe^{fat}/Cpe^{fat} Mäuse sind adipös, infertil und entwickeln eine Hyperproinsulinämie (Naggert et al., 1995). Außerdem konnte die Akkumulation von Peptid-Vorläufern wie Proopiomelanocortin, Proenkephalin, Pro-Dynorphin und Pro-Insulin, sowie eine starke Abnahme der Konzentration biologisch aktiver Peptide wie Insulin, ACTH, Neurotensin, CCK und Gastrin in diesen Mäusen beobachtet werden (Rovere et al., 1996; Fricker et al., 1996; Udupi et al., 1997; Cain et al., 1997; Naggert et al., 1995 Lacourse et al., 1997; Shen et al., 1997).

Eine aktuelle Publikation beschreibt die Generierung von CPE-Knockout-Mäusen, die einen neuronalen und endokrinen Phänotyps zeigen. Die Mausmutanten sind adipös, hyperglukämisch und ihre Reproduktionfähigkeit ist stark beeinträchtigt. Verhaltenspezifische Analysen zeigen, dass diese Mäuse durch reduziert Muskelkraft und Koordination in ihrer Aktivität eingeschränkt sind (Cawley et al., 2004).
Die Lokalisation des CRH-R2 in den intrazellulären Kompartimenten, in denen die Carboxypeptidase E beschrieben wurde, wurde bisher nicht untersucht. Eine Kolokalisation der beiden Proteine wäre jedoch Voraussetzung für eine physiologische Interaktion und müsste hier zunächst untersucht werden. Aufgrund der hier vorliegenden Informationen ist es schwierig, eine Aussage über die funktionelle Bedeutung einer möglichen Interaktion zu treffen.

5.2.2.4 RIKEN Klon 2310057D15

Bei dem RIKEN Klon 2310057D15 handelt es sich um ein bisher nicht charakterisiertes Gen. Die Sequenzanalyse hat außerdem verdeutlicht, dass es sich möglicherweise um eine bisher unbekannte Spleissvariante des RIKEN Klons handelt.

5.2.3 Schlussfolgerung

Physikalische Interaktionen sind häufig der Schlüssel zur Aufklärung biologischer Prozesse wie Signaltransduktion und Transkription. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde die Interaktion der C-terminalen Domäne des CRH-R2 mit anderen intrazellulären Molekülen nicht untersucht. Die Identifizierung potentieller intrazellulärer Interaktionspartner ist aber im Hinblick auf die vielfältigen Funktionen des Rezeptors wichtig. Wir konnten hier die potentielle Interaktion des Rezeptors mit vier Kandidaten, Gnb2, Cpe, Sypl, RIKEN Klon 2310057D15, mittels der *Yeast two-hybrid*-Suche identifizieren und *in vitro* unabhängig verifizieren. Es bietet sich außerdem an, diese Interaktionen im zellulären System mit Hilfe der Koimmunopräzipitation zu verifizieren. Die bekannten Funktionen der Kandidaten weisen auf bisher nicht aufgeklärte Mechanismen des intrazellulären Transports des CRH-R2 und der Regulierung alternativer Signalkaskaden durch den Rezeptor hin. Aussagen zur funktionellen Bedeutung dieser Interaktionen können zum jetztigen Zeitpunkt nicht getroffen werden und bedürfen der Untersuchung mit weiteren Methoden. Zunächst wäre die Kolokalisation dieser Kandidaten mit dem Rezeptor als Voraussetzung einer Interaktion nachzuweisen.

6 Anhang

6.1 Daten der *Microarray*-Analyse

Alle Sequenzen, die die statistischen Kriterien der *Microarray*-Analyse erfüllt haben (accept2=tru oder *p-value* < 0.05), sind aufgeführt. Sortiert wurde nach dem Regulationslevel (f_reg) und Region der jeweiligen Mausmutante. Für die jeweiligen Spotnummern, ist das *accept2*-Kriterium (a2), der *p-value* (p_adj), die *Accession*-Nummer und die Zuordnung zum *Unigene Cluste*r angegeben sowie Gensymbol und Genname angegeben.

Hippokampus CRH-R1$^{+/+}$ vs. CRH-R1$^{-/-}$							
Spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**Accession**	**Unigene cluster**	**Gensymbol**	**Genname**
13997	t	-3,21	0,00	AI849259	7335	Cnbp	cellular nucleic acid binding protein
15500	t	-2,97	0,00	AI413505	28650	Rab6	RAB6, member RAS oncogene family
12476	t	-2,81	0,00	AI413721	17800		Mus musculus 8 days embryo whole body cDNA clone:5730540D15
24094	t	-2,11	0,10	AI839289	29923	Smt3h2	SMT3 (supressor of mif two, 3) homolog 2 (S, cerevisiae)
6292	t	-1,93	0,02	AI852932	28650	Rab6	RAB6, member RAS oncogene family
14205	t	-1,77	0,00	AI847289	256058	MGC58343	hypothetical protein MGC58343
16219	t	-1,71	0,21	AI841101	7729	Aldo3	aldolase 3, C isoform
4672	t	-1,66	0	AI848407	2108	Ttr	transthyretin
23842	t	-1,64	0,01	AI840405			
24097	t	-1,58	0,16	AI847432	32208	Ddx28	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28
1480	t	-1,58	0,00	AI847846	2108	Ttr	transthyretin
5314	t	-1,53	0,00	AI327146	7729	Aldo3	aldolase 3, C isoform
4186	t	-1,49	0,15	AI839996	2560	Rap2ip	Rap2 interacting protein
3353	t	-1,49	0,02	AI854274	21848	Bzw1	basic leucine zipper and W2 domains 1
21553	t	-1,47	0,00	AI841926	20428	Scgf	stem cell growth factor
16013	t	-1,47	0,15	AI849257	3476	Catnb	catenin beta
22080	t	-1,46	0,02	AI843553	918	Hspa5	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)
21785	f	-1,41	0,04	AI846434	246896		Mus musculus, Similar to hypothetical protein FLJ21079, clone IMAGE:4486593, mRNA
7607	f	-1,39	0,01	AI836483	22699	Sepp1	selenoprotein P, plasma, 1
9276	f	-1,39	0,02	W10763	30886	1810013P09Rik	RIKEN cDNA 1810013P09 gene
11497	f	-1,31	0,05	AI847976	21952	Erh	enhancer of rudimentary homolog (Drosophila)
2671	f	-1,29	0,05	AI450185	273799	4930432O21Rik	RIKEN cDNA 4930432O21 gene
5362	f	-1,26	0,04	AI839129	28107	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
21085	f	-1,25	0,05	AI323916	233825	Hbb-b2	hemoglobin, beta adult minor chain
15044	f	-1,19	0,04	AI840542			
23927	f	-1,18	0,02	AI841333	261339		Mus musculus 0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C230039I21
11050	f	-1,15	0,05	AI448950	23344	Stard4	StAR-related lipid transfer (START) domain

Hippokampus CRH-R1$^{+/+}$ vs. CRH-R1$^{-/-}$							
Spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**Accession**	**Unigene cluster**	**Gensymbol**	**Genname**
							containing 4
12762	f	-1,12	0,01	W48899	226655	0610012G03Rik	RIKEN cDNA 0610012G03 gene
23006	f	-1,09	0,02	AI848881			
22930	f	1,10	0,04	AA614884	97614		Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_001329,1
21246	f	1,17	0,05	W35091	91441	Trpv4	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4
8931	f	1,23	0,00	AI835885	41596	Pcoln3	procollagen (type III) N-endopeptidase
17000	f	1,25	0,00	AI849087	2025	Smn	survival motor neuron
12775	f	1,25	0,04	AI839613	2992	Mbp	myelin basic protein
12213	f	1,33	0,02	AI850662	192672		EST
11982	f	1,35	0,03	AI850099	39760	Faim2	Fas apoptotic inhibitory molecule 2
14916	f	1,37	0,00	AI836642			
17568	f	1,38	0,00	AI845366	1268	Plp	proteolipid protein (myelin)
11012	t	1,42	0,05	AI840549	331	Ubc	ubiquitin C
16283	t	1,42	0,12	AI845728	110270	B230217C12Rik	RIKEN cDNA B230217C12 gene
20901	t	1,42	0,00	AI839745	1268	Plp	proteolipid protein (myelin)
15359	t	1,42	0,14	AI841151	1268	Plp	proteolipid protein (myelin)
23781	t	1,44	0,02	AI846136	113827	2900078E11Rik	RIKEN cDNA 2900078E11 gene
5762	t	1,44	0,05	AI842535	4919	D0H4S114	DNA segment, human D4S114
3515	t	1,44	0,07	AI837358	44187	Tm4sf11	transmembrane 4 superfamily member 11
14497	t	1,54	0,11	AI841901	19027	Mocs2	molybdenum cofactor synthesis 2
7820	t	1,59	0,05	AI843407	275683	Ica1	islet cell autoantigen 1
5990	t	1,64	0,14	AI465483	21419	Taf10	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
9031	t	1,74	0,05	AI893459	1120	Ebaf	endometrial bleeding associated factor
4986	t	2,30	0,05	AI842958	252941	Fyco1	FYVE and coiled-coil domain containing 1

Hypophyse CRH-R1$^{+/+}$ vs. CRH-R1$^{-/-}$							
Spot	**a2**	**p_adj**	**f_reg**	**Accession**	**Unigene cluster**	**Gensymbol**	**Genname**
13405	t	0,02	-2,26	AI850488	5160	Ugt8	UDP-glucuronosyltransferase 8
12842	t	0,03	-2,08	AI845231	272524		Mus musculus transcribed sequences
14946	t	0,03	-1,75	AI852848	30151	A2m	alpha-2-macroglobulin
14296	t	0,02	-1,59	AI852254	40548	D030041I09Rik	RIKEN cDNA D030041I09 gene
183	t	0,03	-1,58	AI323948	27395		Mus musculus cDNA clone IMAGE:1379255, partial cds
14620	t	0,08	-1,56	AI853174	143790	Pvrl1	poliovirus receptor-related 1
5115	t	0,08	-1,54	AI666768	7709	Scnn1b	sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta
13902	t	0,07	-1,54	AI854451	253661	E130304D01	hypothetical protein E130304D01
10232	t	0,09	-1,53	AI834874	12468	Gbas	glioblastoma amplified sequence
8622	t	0,09	-1,52	AI841295	267014	Gstk1	glutathione S-transferase kappa 1
10648	t	0,09	-1,46	AI842416			
1153	t	0,09	-1,43	AI413194	22973		Mus musculus adult male cecum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9130233I07 product:unknown EST, full insert sequence
15261	t	0,10	-1,43	AI853846	741	Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal
2525	t	0,03	-1,42	AI429405	52322	Eif4g2	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 2

Hypophyse CRH-R1$^{+/+}$ vs. CRH-R1$^{-/-}$							
Spot	**a2**	**p_adj**	**f_reg**	**Accession**	**Unigene cluster**	**Gensymbol**	**Genname**
14830	f	0,05	-1,41	AI853279	229965	4631427C17Rik	RIKEN cDNA 4631427C17 gene
731	f	0,02	-1,37	AI326236	31646	Actl6	actin-like 6
14716	f	0,03	-1,35	AI853220	44151	Crsp6	cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 6
11841	f	0,03	-1,35	AI849099	39496	Zfpm2	zinc finger protein, multitype 2
632	f	0,03	-1,35	AI324075			
4413	f	0,03	-1,34	AI451558	257276	1110004P21Rik	RIKEN cDNA 1110004P21 gene
11129	f	0,02	-1,33	AI846032	34191	BC036718	cDNA sequence BC036718
12514	f	0,03	-1,33	AI844249	41737	Gng2	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2 subunit
8234	f	0,05	-1,32	AI837687	27536		Mus musculus transcribed sequence with moderate similarity to protein ref:NP_079170.1 (H.sapiens) hypothetical protein FLJ14075 [Homo sapiens]
6004	f	0,05	-1,32	AI835916	158897	2900027G03Rik	RIKEN cDNA 2900027G03 gene
7486	f	0,03	-1,32	AI839783	4880	Cbln1	cerebellin 1 precursor protein
7178	f	0,03	-1,30	AI839293	42949	1110012O05Rik	RIKEN cDNA 1110012O05 gene
10168	f	0,02	-1,29	AI846139	4606	Bcat1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic
10616	f	0,03	-1,27	AI847977	17640	Psmd10	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10
15846	f	0,03	-1,27	AI853451	19111	Prkaca	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha
7540	f	0,04	-1,26	AI840458	29721	2810025M15Rik	RIKEN cDNA 2810025M15 gene
14059	f	0,04	-1,26	AI851914	37722	5830437M04Rik	RIKEN cDNA 5830437M04 gene
15775	f	0,05	-1,26	AI854218			
6113	f	0,02	-1,25	AI836732	52322	Eif4g2	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 2
3781	f	0,03	-1,24	AI450671	40335	Mtr	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase
4449	f	0,04	-1,24	AI450277	34038	2310009A18Rik	RIKEN cDNA 2310009A18 gene
11961	f	0,05	-1,24	AI849330	30017	Gabarapl2	GABA(A) receptor-associated protein like 2
14162	f	0,03	-1,24	AI854417	41711	Pja2	praja 2, RING-H2 motif containing
11875	f	0,05	-1,23	AI849159	44250	Farp1	FERM, RhoGEF (Arhgef) and pleckstrin domain protein 1 (chondrocyte-derived)
6973	f	0,02	-1,22	AI840166	29493	Wdr6	WD repeat domain 6
15378	f	0,04	-1,22	AI851013	5231	9130020K17Rik	RIKEN cDNA 9130020K17 gene
10418	f	0,05	-1,21	AI847900	219678	Pbxip1	pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1
10567	f	0,03	-1,20	AI847956	44201	2610022G08Rik	RIKEN cDNA 2610022G08 gene
13470	f	0,05	-1,19	AI851766	17796	5430433B02Rik	RIKEN cDNA 5430433B02 gene
6129	f	0,03	-1,18	AI835649	41553	E430013E20Rik	RIKEN cDNA E430013E20 gene
13295	f	0,05	-1,18	AI850533	254978	Bmp6	bone morphogenetic protein 6
6000	f	0,04	-1,18	AI838475	4974	Ncam1	neural cell adhesion molecule 1
14844	f	0,03	-1,18	AI853792	15691	Abcg1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
16403	f	0,03	-1,17	AI851144			
2920	f	0,04	-1,17	AI449600	19316	4921521N14Rik	RIKEN cDNA 4921521N14 gene
11393	f	0,05	-1,15	AI849557	182445	Cog1	component of oligomeric golgi complex 1
3674	f	0,05	-1,12	AI449931	30167	4732497O03Rik	RIKEN cDNA 4732497O03 gene
7088	f	0,05	-1,11	AI839271	21069	Hsbp1	heat shock factor binding protein 1
12302	f	0,03	1,08	AI849700			
6992	f	0,05	1,09	AI838669	21667	Psmd12	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12
7151	f	0,04	1,09	AI838773	34087	A730024A03Rik	RIKEN cDNA A730024A03 gene

Hypophyse CRH-R1$^{+/+}$ vs. CRH-R1$^{-/-}$							
Spot	**a2**	**p_adj**	**f_reg**	**Accession**	**Unigene cluster**	**Gensymbol**	**Genname**
12644	f	0,03	1,18	AI849795	9901	Nucb2	nucleobindin 2
1655	f	0,03	1,18	AI427428	249651	Xpa	xeroderma pigmentosum, complementation group A
5427	f	0,03	1,21	AI835221	28203	D11Ertd175e	DNA segment, Chr 11, ERATO Doi 175, expressed
8637	f	0,05	1,22	AI843407	275683	Ica1	islet cell autoantigen 1
4107	f	0,02	1,24	AI449281	30554		Mus musculus transcribed sequences
7645	f	0,03	1,25	AI839442			
665	f	0,04	1,26	AI385536	257437	Cdh2	cadherin 2
2371	f	0,05	1,27	AI428433	45357	Erbb2ip	Erbb2 interacting protein
13927	f	0,03	1,27	AI851795	29531		Mus musculus, clone IMAGE:5355681, mRNA
3041	f	0,03	1,28	AI449447	32171		Mus musculus transcribed sequences
10119	f	0,04	1,28	AI846123	27453	Grsf1	G-rich RNA sequence binding factor 1
15260	f	0,03	1,31	AI853843	22021	2410006F12Rik	RIKEN cDNA 2410006F12 gene
14036	f	0,04	1,35	AI852492	40035	Pak3	p21 (CDKN1A)-activated kinase 3
3883	f	0,04	1,37	AI451128	26546	Bklhd2	BTB and kelch domain containing 2
7627	f	0,05	1,41	AI839615	132309	Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2
6076	t	0,05	1,42	AI835881			
14068	t	0,10	1,42	AI851848	4514	Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1
821	t	0,09	1,44	AI325494	28919	Dstn	destrin
9724	t	0,09	1,47	AI847765	41642	Rgs4	regulator of G-protein signaling 4
7080	t	0,08	1,48	AI841889	5017	Col11a1	procollagen, type XI, alpha 1
5499	t	0,08	1,49	AI835109			
8582	t	0,10	1,49	AI843378	6441	Dncic2	dynein, cytoplasmic, intermediate chain 2
666	t	0,03	1,50	AI326787	1514	Lpl	lipoprotein lipase
9537	t	0,11	1,51	AI843623	182628	Rad21	RAD21 homolog (S. pombe)
10151	t	0,05	1,52	AI847363	27570	Ndufa6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6 (B14)
7735	t	0,08	1,59	AI840232	35439	Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein
10686	t	0,02	1,61	AI847452	70945	Slc17a6	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6
3167	t	0,02	1,62	AI447993	175310	H2-Aa	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha
16095	t	0,09	1,64	AI854679	29344	Tde2	tumor differentially expressed 2
2465	t	0,02	1,64	AI428471	27089	Spock3	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 3
9256	t	0,10	1,69	AI843660	241073	Enc1	ectodermal-neural cortex 1
8647	t	0,09	1,71	AI834826	3679	Ttc3	tetratricopeptide repeat domain 3
6197	t	0,08	2,01	AI836099	52322	Eif4g2	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 2
10757	t	0,11	2,22	AI842476	57070	Ptch	patched homolog

Hippocampus CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**acc_no**	**cluster_id**	**Gensymbol**	**Genname**
23617	t	0,20	-1,99	AI853984	43974	Rgma	RGM domain family, member A
13930	t	0,25	-1,93	AI839351	40741	9630019K15Rik	RIKEN cDNA 9630019K15 gene
20907	t	0,17	-1,87	AI850277	154879	Nmu	neuromedin
7803	t	0,12	-1,84	AI850299	28323	Tsnaxip1	translin-associated factor X (Tsnax) interacting protein 1
18909	t	0,17	-1,84	AI846342			
2049	t	0,00	-1,77	AI851696			
11601	t	0,03	-1,71	AI846864	30071	Laptm4a	lysosomal-associated protein transmembrane 4A
19080	t	0,04	-1,69	AI850036			
8675	t	0,16	-1,67	AI429183	334499	1700001E04Rik	RIKEN cDNA 1700001E04 gene
6523	t	0,07	-1,67	AI853943	39496	Zfpm2	zinc finger protein, multitype 2
5167	t	0,01	-1,65	AI413651	193701	Clstn3	calsyntenin 3
18460	f	0,04	-1,63	AI894211	41776	Oc90	otoconin 90
3370	t	0,00	-1,62	AI847573			
6292	t	0,03	-1,60	AI852932	28650	Rab6	RAB6, member RAS oncogene family
9276	t	0,14	-1,57	W10763			
20673	t	0,04	-1,56	AI846827	254267	Oxr1	oxidation resistance 1
6131	t	0,12	-1,50	AI226619	355334		Adult male bone cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9830163F24 product:unknown EST, full insert sequence
15500	t	0,07	-1,49	AI413505			
22704	t	0,04	-1,49	AI450589			
424	t	0,15	-1,46	AI448808	210845	Unc84a	unc-84 homolog A (C. elegans)
11081	t	0,17	-1,46	AI853052	245210	Lrig1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1
470	t	0,17	-1,45	AI837766	34002	2410015M20Rik	RIKEN cDNA 2410015M20 gene
1480	t	0,07	-1,45	AI847846	2108	Ttr	transthyretin
16846	t	0,24	-1,44	AI666292	244233	E230011A21Rik	RIKEN cDNA E230011A21 gene
10921	t	0,08	-1,43	AI326932	14022	Cox8a	cytochrome c oxidase, subunit VIIIa
9628	t	0,02	-1,43	AI849477	40741	9630019K15Rik	RIKEN cDNA 9630019K15 gene
11497	t	0,04	-1,43	AI847976	324007		Transcribed sequence with strong similarity to protein prf:2208314A (H.sapiens) 2208314A ERH gene [Homo sapiens]
9000	t	0,21	-1,43	AI850045	183979		Adult male diencephalon cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9330131I22 product:unknown EST, full insert sequence
14467	f	0,05	-1,39	AA545348	86448		Transcribed sequence with weaksimilarity to protein ref:NP_067008.1 (H.sapiens)hypothetical protein DKFZp434A1022 [Homo sapiens]
16462	f	0,02	-1,36	AA548992	109074	4930470D19Rik	RIKEN cDNA 4930470D19 gene
4672	f	0,01	-1,34	AI848407	2108	Ttr	transthyretin
13260	f	0,00	-1,31	AI843784	277886	Ikbkb	inhibitor of kappaB kinase beta
15353	f	0,00	-1,31	AI429749	28221	AW544865	expressed sequence AW544865
5362	f	0,00	-1,29	AI839129	250256	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
9380	f	0,04	-1,26	AI851029	234998	Accn1	amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin)
4608	f	0,04	-1,25	AI846538			
15300	f	0,04	-1,23	AI850499			
9339	f	0,05	-1,23	AI390897	235283	Dpysl2	dihydropyrimidinase-like 2

Hippocampus CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**acc_no**	**cluster_id**	**Gensymbol**	**Genname**
11181	f	0,04	-1,20	AI847319	6836	Arf1	ADP-ribosylation factor 1
21331	f	0,05	-1,19	AA050106	146087	0610009D07Rik	RIKEN cDNA 0610009D07 gene
4649	f	0,04	-1,18	AI846427			
7457	f	0,03	-1,16	AI415695	308747		Transcribed sequence with moderate similarity to protein pir:S12207 (M.musculus) S12207 hypothetical protein
9857	f	0,03	-1,16	AI841298	23671	1500031H04Rik	RIKEN cDNA 1500031H04 gene
1065	f	0,03	1,11	W53477	259318	Rarb	retinoic acid receptor, beta
1392	f	0,01	1,16	AI836712	16775	Rps24	ribosomal protein S24
19401	f	0,04	1,21	AA399787	295031	Ddx27	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 27
5314	f	0,01	1,21	AI327146	7729	Aldoc	aldolase 3, C isoform
23109	f	0,05	1,21	AI843695	277527	Slc37a3	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3
19662	f	0,01	1,23	AI838219			
4836	f	0,02	1,24	AI836652	282093	Ubb	ubiquitin B
15219	f	0,05	1,26	AI430647	200898	AU041707	expressed sequence AU041707
8805	f	0,02	1,26	AI839749			
4260	f	0,02	1,27	AA412837	102206		14, 17 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:3222402J19 product:unknown EST, full insert sequence
18952	f	0,05	1,27	AI848085	289702	Syt1	synaptotagmin 1
2864	f	0,05	1,29	AI840661	335315	Eef1a1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
9477	f	0,02	1,30	AI835922			
16407	f	0,02	1,32	AI836755	250596		Similar to Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor 1 A-1) (eEF1A-1) (Elongation factor Tu) (EF-Tu)
12270	f	0,04	1,34	AI836893	331437		Transcribed sequence with strong similarity to protein sp:P08865 (H.sapiens) RSP4_HUMAN 40S ribosomal protein SA
11548	t	0,13	1,41	AA529366	139192	Gnb4	guanine nucleotide binding protein, beta 4
2642	t	0,02	1,42	AA268387	79837	Arfrp2	ADP-ribosylation factor related protein 2
11540	t	0,03	1,43	AI848270	121920	Sorl1	sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing
9479	t	0,04	1,44	AI837658	3823	Elavl2	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)
17310	t	0,19	1,46	AI836625			
13970	t	0,11	1,48	AI464357	32762		RIKEN cDNA 9930031P18 gene
1821	t	0,01	1,49	AI413225			
5248	t	0,18	1,52	AA793433	347421	Enpep	glutamyl aminopeptidase
15359	t	0,11	1,53	AI841151	1268	Plp	proteolipid protein (myelin)
20606	t	0,25	1,56	AI451698	274756	2810468K05Rik	RIKEN cDNA 2810468K05 gene
12481	t	0,07	1,65	AI841902	254169	D19Ertd386e	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 386, expressed
4080	t	0,21	1,69	AI840074	290530	E430034L04Rik	RIKEN cDNA E430034L04 gene
17426	t	0,21	1,79	AA184105	101591	Daf1	decay accelerating factor 1
13981	t	0,08	1,93	AI430260	27913	2610016F04Rik	RIKEN cDNA 2610016F04 gene
18579	t	0,16	2,06	AI851340	32292		Transcribed sequences
18215	t	0,01	2,07	AI843451	335315	Eef1a1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
16536	t	0,02	2,21	AI845552			

Amygdala CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**acc_no**	**cluster_id**	**Gensymbol**	**Genname**
16682	t	-1,92	0,00	AI843288			
23115	f	-1,81	0,00	AI851574	22575	Maged2	Melanoma antigen, family D, 2
2942	t	-1,75	0,03	AI413735	258404	2610009I02Rik	RIKEN cDNA 2610009I02 gene
14586	t	-1,74	0,00	AI844948	28485	2010001A14Rik	RIKEN cDNA 2010001A14 gene
19080	t	-1,74	0,00	AI850036			
56	t	-1,72	0,04	AI854896	5142	Nptx1	
618	t	-1,70	0,07	AI846500	306482	Polr3k	Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K
22772	f	-1,68	0,00	AI843605	6844	0610010E21Rik	RIKEN cDNA 0610010E21 gene
14439	t	-1,67	0,00	AI850020	2681	Hfe	Hemochromatosis
13218	t	-1,65	0,07	AI843815	29609	D19Ertd144e	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 144, expressed
12188	t	-1,63	0,06	AI845829	6559	Asgr1	Asialoglycoprotein receptor 1
14607	t	-1,63	0,00	AI844713	352970		Hypothetical gene supported by AK019108; NM_183133
15321	t	-1,62	0,08	AI850180			
3185	t	-1,61	0,00	AI853444	159636	2610042L04Rik	RIKEN cDNA 2610042L04 gene
15111	t	-1,60	0,00	AI844703	32883	Fbxo23	F-box only protein 23
15972	f	-1,60	0,00	AI849987	2379	Smpdl3a	Sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A
3996	t	-1,59	0,00	AI836978			
14460	t	-1,59	0,00	AI845085			
14481	t	-1,58	0,00	AI844672	83981	4933428L19Rik	RIKEN cDNA 4933428L19 gene
11126	t	-1,58	0,06	AA254073	245741	9530025L16Rik	RIKEN cDNA 9530025L16 gene
6918	t	-1,57	0,07	AI843623	182628	Rad21	RAD21 homolog (S. pombe)
1293	t	-1,56	0,01	AI854390	41364	D330038O06	Hypothetical protein D330038O06
14544	t	-1,56	0,00	AI845325	14485	Tex9	Testis expressed gene 9
15734	t	-1,56	0,01	AI835125	272130	Pscd2	Pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 2
18953	t	-1,55	0,07	AI844538			
20846	f	-1,55	0,04	AI851214			
15006	t	-1,55	0,00	AI850079	24313	Pib5pa	Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase, A
14859	t	-1,54	0,01	AI850282	340095	Ndufs3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3
15510	t	-1,54	0,00	AI845065			
16077	t	-1,53	0,00	AI845238	29815	Mat2a	Methionine adenosyltransferase II, alpha
16014	t	-1,51	0,00	AI850097			
15027	t	-1,51	0,00	AI844960	256588		Gene model 1060, (NCBI)
15635	t	-1,50	0,00	AI844424	257482	Aatf	Apoptosis antagonizing transcription factor
16119	t	-1,50	0,00	AI845147	96211	Sri	Sorcin
8236	t	-1,49	0,03	AI451081	273659	Adprtl3	ADP-ribosyltransferase (NAD+, poly (ADP-ribose polymerase)-like 3
15594	t	-1,49	0,00	AI845295	34316	Arid5a	AT rich interactive domain 5A (Mrf1 like)
18831	f	-1,49	0,04	AI390172	36217	Tcfec	Transcription factor EC
5990	f	-1,48	0,03	AI465483	285771	Taf10	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
19106	t	-1,48	0,05	AA110154	342364	AF397014	CDNA sequence AF397014
15677	t	-1,48	0,02	AI844383	9052	Pgrmc1	Progesterone receptor membrane component 1
10402	t	-1,48	0,05	AI839103	18832	Hpgd	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)
15489	f	-1,48	0,04	AI844687	274432	Ppp3cb	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isoform

Amygdala CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**acc_no**	**cluster_id**	**Gensymbol**	**Genname**
15069	t	-1,48	0,00	AI845192	2477	Prph1	Peripherin 1
4858	t	-1,47	0,02	AI839341			
5709	t	-1,46	0,07	AA511904	218851	Eif2s3x	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene X-linked
9628	t	-1,46	0,08	AI849477	40741	9630019K15Rik	RIKEN cDNA 9630019K15 gene
20673	t	-1,45	0,01	AI846827	254267	Oxr1	Oxidation resistance 1
17176	t	-1,45	0,01	AA709963	40706	Hkr2	GLI-Kruppel family member HKR2
7442	f	-1,45	0,03	AI840741			
17574	t	-1,44	0,03	AA275872	31376	4732474O15Rik	RIKEN cDNA 4732474O15 gene
15552	t	-1,44	0,00	AI845375	5083	Rab3a	RAB3A, member RAS oncogene family
15468	t	-1,43	0,00	AI849891			
14832	f	-1,43	0,01	AI836400	268548	Max	Max protein
15993	f	-1,42	0,00	AI844927	294821	0610042I15Rik	RIKEN cDNA 0610042I15 gene
1857	t	-1,42	0,09	AI843154	318259	Faf1	Fas-associated factor 1
15426	t	-1,42	0,01	AI850369	121485	Sfxn5	Sideroflexin 5
18124	f	-1,42	0,01	AI323564	297109	Nf2	Neurofibromatosis 2
6201	f	-1,41	0,00	AI837840	4654	Ptpn5	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 5
14013	f	-1,41	0,03	AI835855	285993	Calm1	Calmodulin 1
2188	f	-1,40	0,01	AI451089	214746	Fbxl3a	F-box and leucine-rich repeat protein 3a
4500	f	-1,40	0,01	AI835675	222320	Gpm6b	DNA segment, Chr X, ERATO Doi 242, expressed
5502	f	-1,40	0,01	AA185709	210361	Cd3e	CD3 antigen, epsilon polypeptide
12672	f	-1,40	0,00	AI846532	354720	Gnao1	Guanine nucleotide binding protein, alpha o
21528	f	-1,39	0,05	AI427146	359714		Transcribed locus
17575	f	-1,38	0,01	AA543204	21421	Rpl36	RIKEN cDNA A430109H19 gene
16833	f	-1,38	0,00	AI850308	329243	Calm2	Calmodulin 2
19662	f	-1,38	0,00	AI838219			
15062	f	-1,38	0,03	AI465457	223946	2610019N13Rik	RIKEN cDNA 2610019N13 gene
16494	f	-1,37	0,03	AI846764	2608	Bgn	Biglycan
14397	f	-1,36	0,05	AI854359	39948		Transcribed locus
12214	f	-1,36	0,01	AI853159	224820	Gabpb2	GA repeat binding protein, beta 2
22656	f	-1,35	0,04	AA387012	131118	Dmt2	Dorso-medial telencephalon gene 2
12339	f	-1,35	0,01	AI854399			
11155	f	-1,35	0,00	AI450121			
14476	f	-1,35	0,05	AI838600			
5059	f	-1,33	0,00	AA711444	24516	Strn	Striatin, calmodulin binding protein
509	f	-1,32	0,04	AI836500	228619	Manbal	Mannosidase, beta A, lysosomal-like
17568	f	-1,31	0,04	AI845366	1268	Plp1	Proteolipid protein (myelin) 1
11275	f	-1,31	0,02	AA592618	257094	Itgb3bp	Integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)
14985	f	-1,31	0,00	AI844893			
16917	f	-1,31	0,03	AI850241	22031	Cstf2t	Cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA subunit 2, tau
7671	f	-1,31	0,03	AI838523	28298	AI480556	Expressed sequence AI480556
10230	f	-1,30	0,00	AI451987			
15447	f	-1,30	0,05	AI854334	132006	Ttc15	Tetratricopeptide repeat domain 15
14943	f	-1,30	0,02	AI850201	177761	Clcn2	Expressed sequence AL118368
9477	f	-1,30	0,00	AI835922			
8328	f	-1,29	0,01	AI850390	19440	BC066223	CDNA sequence BC066223
13304	f	-1,29	0,04	AI848868	31752	Cd47	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)

Amygdala CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**acc_no**	**cluster_id**	**Gensymbol**	**Genname**
3370	f	-1,29	0,02	AI847573			
21242	f	-1,29	0,02	AI844061			
4700	f	-1,29	0,02	AA254318	291085	4930522L14Rik	RIKEN cDNA 4930522L14 gene
11033	f	-1,28	0,05	AI837672			
7909	f	-1,28	0,02	AI852766	207484	A830041P22Rik	RIKEN cDNA A830041P22 gene
1800	f	-1,27	0,02	W13188	24026	Hcst	Hematopoietic cell signal transducer
1582	f	-1,27	0,02	AI841447			
5520	f	-1,27	0,02	AA286355	362043	D0Kist3	DNA segment, KIST 3
10414	f	-1,26	0,03	AA574694	313866	Gata3	GATA binding protein 3
1472	f	-1,26	0,05	AI413691	6890	Mageh1	Melanoma antigen, family H, 1
16748	f	-1,26	0,02	AI844199	340257	2310047M10Rik	RIKEN cDNA 2310047M10 gene
17442	f	-1,26	0,01	AI850365	196580	Ube2m	Ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast)
18016	f	-1,26	0,01	AA536879	207298	Zfp142	Zinc finger protein 142
15231	f	-1,25	0,05	AI837967			
9553	f	-1,25	0,04	AA671089			
20063	f	-1,25	0,05	AI840930			
7137	f	-1,24	0,00	AA510225	211535	Olfml3	Olfactomedin-like 3
8018	f	-1,24	0,00	AA109839	87724	Fhod1	Formin homology 2 domain containing 1
11212	f	-1,23	0,01	AA718051	220886	Taf6l	TAF6-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor
14775	f	-1,23	0,05	AI851764	188734	Adk	Adenosine kinase
14320	f	-1,23	0,03	AA547533	244047	Nin	Ninein
12447	f	-1,22	0,03	AI851520	52275	Pet112l	PET112-like (yeast)
9276	f	-1,22	0,04	W10763			
14112	f	-1,22	0,03	AA497494	8983	Tnfsf13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13
9174	f	-1,21	0,03	AA472746	86557	Adpn	Adiponutrin
4366	f	-1,21	0,05	AA606977	288565	2810441O16Rik	RIKEN cDNA 2810441O16 gene
10368	f	-1,21	0,04	W09376	334138		Predicted gene ICRFP703B1614Q5.6
3252	f	-1,21	0,05	AA420070	249391	Hectd1	HECT domain containing 1
6970	f	-1,21	0,05	AA543237	219675	A930009M04Rik	RIKEN cDNA A930009M04 gene
17064	f	-1,20	0,02	AI850037	240396	Ppp2r5c	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), gamma isoform
17252	f	-1,20	0,00	AI844028	275981	Secisbp2	SECIS binding protein 2
16098	f	-1,19	0,01	AI849946			
13731	f	-1,18	0,02	AA471862	4040	Myo6	Myosin VI
23796	f	-1,18	0,03	AI447679	322159		Transcribed locus, moderately similar to XP_142545.2 similar to DKFZP572C163 protein [Mus musculus]
1236	f	-1,18	0,03	AA469789	252145	Ckmt1	Creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous
15282	f	-1,18	0,04	W42271	272927	Dpm3	Dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 3
7962	f	-1,18	0,03	AI429492	254463	BC043476	CDNA sequence BC043476
8916	f	-1,17	0,05	AI849973			
11980	f	-1,17	0,04	AI842420	151332	Pex2	Peroxin 2
3304	f	-1,16	0,03	AI839176	210745	Glul	RIKEN cDNA 5830403L16 gene
5447	f	-1,16	0,00	AI839200	4714	Yaf2	RIKEN cDNA D030074K08 gene
19016	f	-1,15	0,00	AI849086			
24120	f	-1,15	0,05	AI850055	330070	Inpp5e	Inositol polyphosphate-5-phosphatase E

Amygdala CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**acc_no**	**cluster_id**	**Gensymbol**	**Genname**
7925	f	-1,14	0,04	AI841041	281700	Hap1	Huntingtin-associated protein 1
21159	f	-1,13	0,00	AI844698	2210	Abca2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2
8837	f	-1,13	0,02	AA200002	271936	BC036961	CDNA sequence BC036961
10498	f	-1,13	0,03	AA510863	264045		Transcribed locus
12995	f	-1,12	0,05	AA288891	96867	Rnf141	Ring finger protein 141
10885	f	-1,12	0,04	AI840046	41862	2310047D13Rik	RIKEN cDNA 2310047D13 gene
19051	f	-1,12	0,03	AI449936	302791	3100002P13Rik	RIKEN cDNA 3100002P13 gene
3588	f	-1,09	0,05	AA616844	260479	Jmjd1a	Jumonji domain containing 1A
19695	f	-1,09	0,02	AA462202	246332	Bst1	Bone marrow stromal cell antigen 1
21952	f	-1,07	0,03	AI838847			
11169	f	-1,06	0,03	AA511704	149438	Mtus1	Mitochondrial tumor suppressor 1
20962	f	1,07	0,00	AI451115	2215	Tcof1	Treacher Collins Franceschetti syndrome 1, homolog
19957	f	1,08	0,03	AI840048			
6129	f	1,09	0,03	AA511619	127156	Pros1	Protein S (alpha)
22623	f	1,09	0,02	AI835702	287807	Gm2a	GM2 ganglioside activator protein
11548	f	1,09	0,05	AA529366	139192	Gnb4	Guanine nucleotide binding protein, beta 4
18803	f	1,10	0,04	AI842640	103427	A730042J05Rik	RIKEN cDNA A730042J05 gene
10632	f	1,10	0,02	AI838151	252063	Mbp	Myelin basic protein
6456	f	1,11	0,03	AI846727	207496	Prkcb1	Protein kinase C, beta 1
9339	f	1,11	0,03	AI390897	235283	Dpysl2	Dihydropyrimidinase-like 2
7284	f	1,11	0,03	AA419998	548	Cox6c	V-src suppressed transcript 3
18079	f	1,12	0,01	AA549227	282863	Bpgm	2,3-bisphosphoglycerate mutase
20130	f	1,12	0,04	AI849943	369565		Transcribed locus
3931	f	1,12	0,01	AI450057	295605	A430097D04Rik	DNA segment, Chr 15, Brigham & Women's Genetics 0759 expressed
9835	f	1,12	0,05	AI839777	241700	Gpm6a	Glycoprotein m6a
6999	f	1,13	0,02	AI835625	361402		Transcribed locus, highly similar to NP_058856.1 ribosomal protein S6 [Rattus norvegicus]
5209	f	1,13	0,02	AI327242	260042	1500032L24Rik	RIKEN cDNA 1500032L24 gene
21331	f	1,13	0,04	AA050106	146087	BC068281	CDNA sequence BC068281
22918	f	1,14	0,04	AI838871	45953	Snap25	Synaptosomal-associated protein 25
16518	f	1,14	0,02	AI845043	272120	Gad1	Glutamic acid decarboxylase 1
12944	f	1,14	0,04	AI840652	335395	Rab6b	RAB6B, member RAS oncogene family
3476	f	1,15	0,03	AI848275	290353	1810045K07Rik	RIKEN cDNA 1810045K07 gene
4146	f	1,16	0,03	AI843805	45953	Snap25	Synaptosomal-associated protein 25
3922	f	1,16	0,05	AA000871	222711	Mtmr7	Myotubularin related protein 7
7861	f	1,16	0,03	AI840050	219245	Scoc	Short coiled-coil protein
15760	f	1,16	0,05	AI848415	246412	1700020I14Rik	RIKEN cDNA 1700020I14 gene
12762	f	1,16	0,03	W48899	347369	0610012G03Rik	RIKEN cDNA 0610012G03 gene
18087	f	1,17	0,00	AI835775	38951	Sucla2	Succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit
2952	f	1,17	0,04	AI850051	305750	Rpl27a	Ribosomal protein L27a
12425	f	1,17	0,02	AI854256	271670	Galnt10	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10
3449	f	1,18	0,04	AI465217			
2784	f	1,18	0,04	AI850808	34319	Ywhab	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide
17312	f	1,18	0,02	AI845689	16716	Lamp1	Lysosomal membrane glycoprotein 1
9473	f	1,19	0,05	AI415691	63584	1110030H18Rik	RIKEN cDNA 1110030H18 gene

Amygdala CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**acc_no**	**cluster_id**	**Gensymbol**	**Genname**
7819	f	1,19	0,03	AI839779	268346	Zfp365	Zinc finger protein 365
10234	f	1,20	0,05	AI839993	332497	9330185J12Rik	RIKEN cDNA 9330185J12 gene
15796	f	1,20	0,05	AI451231	262825		Transcribed locus
14138	f	1,20	0,01	AI835438			
8954	f	1,21	0,04	AI840597			
14444	f	1,21	0,05	AA171191	254974	5730472N09Rik	RIKEN cDNA 5730472N09 gene
10771	f	1,21	0,02	AA611170	288374		Transcribed locus
12582	f	1,21	0,02	AI426928			
5533	f	1,21	0,02	AI847909	25661	1700030A21Rik	RIKEN cDNA 1700030A21 gene
11536	f	1,21	0,03	AI838336	24031	4933431N12Rik	RIKEN cDNA 4933431N12 gene
14321	f	1,21	0,04	AI173962	260009	Nsun2	NOL1/NOP2/Sun domain family 2
24158	f	1,21	0,00	AI841020	336204		Similar to phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3) - mouse
5934	f	1,22	0,04	AI850105	271947	Stmn1	Stathmin 1
16683	f	1,22	0,04	AI842162			
15052	f	1,22	0,01	AA008054	16469	Nmyc1	Neuroblastoma myc-related oncogene 1
1664	f	1,23	0,00	AI835106	2718	Eef1b2	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2
15090	f	1,23	0,01	AI849916	116711	Exosc9	Exosome component 9
12731	f	1,23	0,05	AI835407			
20654	f	1,23	0,05	AI849531	40312	Kcnc3	Potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 3
18601	f	1,23	0,02	W67004	272389	2900010M23Rik	Expressed sequence AL117801
18614	f	1,23	0,04	AI837752	43278	Olfm1	Olfactomedin 1
15167	f	1,23	0,01	AI836153	318331	4931406I20Rik	RIKEN cDNA 4931406I20 gene
6986	f	1,24	0,05	AI853679	2171	Atpif1	ATPase inhibitory factor 1
11281	f	1,24	0,01	AI449143	285993	Calm1	Calmodulin 1
14951	f	1,24	0,01	AI114965			
17776	f	1,24	0,05	AI848414	207767	Timm10	Translocase of inner mitochondrial membrane 10 homolog (yeast)
16015	f	1,24	0,02	AI851926	23896	1200007B05Rik	RIKEN cDNA 1200007B05 gene
23006	f	1,25	0,03	AI848881			
625	f	1,25	0,05	AA048249	272632	Xlkd1	Extra cellular link domain-containing 1
1459	f	1,25	0,01	AI847945	319500	Il17d	Interleukin 17D
6103	f	1,25	0,05	AI854555			
14245	f	1,25	0,05	AI841510	350516	Ywhaq	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide
5192	f	1,25	0,01	AI835248	41560	Serpini1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade I, member 1
21782	f	1,25	0,03	AI836122	1843	Hspca	Heat shock protein 1, alpha
15042	f	1,26	0,03	AI836986	290774		MRNA fragment for heat shock cognate hsc73
24056	f	1,26	0,00	AI849104	289248	Tceb1	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1
3100	f	1,26	0,05	AI853791	204969	Spna2	Spectrin alpha 2
20489	f	1,26	0,04	AI854252	214361	Sall1	Sal-like 1 (Drosophila)
13059	f	1,26	0,04	AA276386	206759	Lrp11	Low density lipoprotein receptor-related protein 11
8957	f	1,26	0,00	AI849240	39760	Faim2	Fas apoptotic inhibitory molecule 2
3808	f	1,26	0,01	AI838867	212703	Mdh1	RIKEN cDNA B230377B03 gene
7070	f	1,27	0,04	AI854686	335942	Set	SET translocation
20472	f	1,27	0,04	AA474134	18652	Sms	Spermine synthase
21045	f	1,27	0,01	AI448204	202358	Kpna6	Karyopherin (importin) alpha 6

Amygdala CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**acc_no**	**cluster_id**	**Gensymbol**	**Genname**
3745	f	1,27	0,01	AI839589	233813	Ywhag	3-monooxgenase/tryptophan 5-monooxgenase activation protein, gamma polypeptide
4877	f	1,27	0,02	AI464573	41	Atp5o	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit
21956	f	1,27	0,00	AI849435	30113		Similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit, mitochondrial precursor (Complex I-30KD) (CI-30KD)
10490	f	1,27	0,03	AI848283	297650	C630002N23Rik	RIKEN cDNA C630002N23 gene
14642	f	1,27	0,04	AI836324	31395	Cpe	Carboxypeptidase E
15491	f	1,28	0,05	AI853036	248827	Canx	Calnexin
3130	f	1,28	0,03	AI528850	236443	Fasn	Fatty acid synthase
13009	f	1,28	0,00	AI847419	133086	D430030K24Rik	RIKEN cDNA D430030K24 gene
12511	f	1,28	0,02	AI413841	269211	Map3k10	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 10
3414	f	1,28	0,00	AI845076	28779	Usp54	Ubiquitin specific protease 54
15063	f	1,29	0,00	AI835619	335368		Transcribed locus, highly similar to NP_032933.1 peptidylprolyl isomerase A [Mus musculus]
14195	f	1,29	0,03	AI227140	132237	Mapre2	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2
23597	f	1,29	0,02	AI852994	26515	4932416A11Rik	RIKEN cDNA 4932416A11 gene
4335	f	1,29	0,05	AI845923	192591	4930504B08Rik	RIKEN cDNA 4930504B08 gene
16639	f	1,30	0,05	AI837226	260938	Pkp4	Plakophilin 4
16773	f	1,30	0,01	W70432	295618	Rps23	Ribosomal protein S23
6120	f	1,31	0,01	AI843835	3951	Thy1	Thymus cell antigen 1, theta
10305	f	1,31	0,03	W17596	260288	Ppp2ca	Protein phosphatase 2a, catalytic subunit, alpha isoform
10993	f	1,31	0,01	AI847420	163017	Snx14	Sorting nexin 14
6830	f	1,31	0,01	AI661153	10528	Hars	Histidyl-tRNA synthetase
5724	f	1,31	0,04	AI850597	21645	Anapc11	Anaphase promoting complex subunit 11 homolog (yeast)
14391	f	1,31	0,02	AI836758	295263	Dcamkl1	Double cortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1
14659	f	1,32	0,01	AI415314	360603		Transcribed locus, moderately similar to XP_195691.2 similar to ORF [Mus musculus]
20553	f	1,32	0,04	AI851374	270469	D5Bwg0860e	DNA segment, Chr 5, Brigham & Women's Genetics 0860 expressed
16236	f	1,32	0,02	AI448582	259901	Rps6ka2	Ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 2
1210	f	1,33	0,03	AI852046			
16007	f	1,33	0,02	AI464529	276355	Slc34a1	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 1
14644	f	1,33	0,01	AI841459	2785	Dbi	Diazepam binding inhibitor
14228	f	1,33	0,05	AI844003	180410	4930566A11Rik	RIKEN cDNA 4930566A11 gene
14917	f	1,33	0,00	AI840044	235523	Spg20	Spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome) homolog (human)
18546	f	1,33	0,02	AI427043			
5251	f	1,33	0,04	AI326084	8911	Psmb5	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 5
22590	f	1,34	0,05	AI854625	228067	C330005L02Rik	RIKEN cDNA C330005L02 gene
15572	f	1,34	0,05	AI848268	9221	Rab4a	RAB4A, member RAS oncogene family
11078	f	1,35	0,02	AI848628	275446	Drap1	Dr1 associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)
8687	f	1,35	0,00	AI854246			
16573	f	1,36	0,02	AI447731	3820	Cmas	Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid synthetase

Amygdala CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**acc_no**	**cluster_id**	**Gensymbol**	**Genname**
176	f	1,36	0,05	AI845694	39738	Pcdh19	Protocadherin 19
15694	f	1,36	0,01	AI841431			
1901	f	1,37	0,02	AI849269	368158		Transcribed locus
17985	f	1,37	0,03	AI843136	26722	Ndrg2	N-myc downstream regulated gene 2
14939	f	1,37	0,01	AI841233	101976	A330043J11Rik	RIKEN cDNA A330043J11 gene
7730	f	1,38	0,03	AI427657	39739	Hspa12a	Heat shock 70kDa protein 12A
12296	f	1,38	0,04	AI848849	213408	Ttc3	Tetratricopeptide repeat domain 3
18134	f	1,38	0,04	AI848680	261681	2510015F01Rik	RIKEN cDNA B930019K04 gene
9545	f	1,39	0,03	AI844860	10407	Nicn1	Nicolin 1
6040	f	1,40	0,03	AI854455			
14176	f	1,40	0,01	AI324671	358632	Rpl30	RIKEN cDNA D730044K07 gene
15251	f	1,40	0,02	AI836347	324696	Tuba2	Tubulin, alpha 2
14601	f	1,41	0,00	AI835499			
17119	f	1,42	0,01	AI449756	32231	4922501K12Rik	RIKEN cDNA 4922501K12 gene
15824	t	1,42	0,00	AI848998	221275	Rtn1	Reticulon 1
9864	t	1,43	0,06	AI451785	12947	MGC27770	Hypothetical protein MGC27770
14205	t	1,44	0,05	AI847289	256058	BC055107	CDNA sequence BC055107
4357	t	1,44	0,08	AI842483	285968	1810073M12Rik	RIKEN cDNA 1810073M12 gene
11939	t	1,45	0,04	AI849293	2931	Flot1	Flotillin 1
14597	t	1,45	0,05	AI413204	26722	Ndrg2	N-myc downstream regulated gene 2
18142	t	1,45	0,02	AA511535	38087	Tmem16f	Transmembrane protein 16F
8041	t	1,46	0,04	AA549274	213114	9130423L19Rik	RIKEN cDNA 9130423L19 gene
12517	t	1,47	0,01	AI893576	230169	Got2	Glutamate oxaloacetate transaminase 2, mitochondrial
9417	t	1,47	0,08	AI843055	301204	Elf1	E74-like factor 1
17465	t	1,48	0,02	AI854266	1008	Ptgds	Prostaglandin D2 synthase (brain)
18464	t	1,48	0,03	AI666784	227598	Prkcbp1	Protein kinase C binding protein 1
15230	t	1,50	0,00	AI835305	359747		Transcribed locus
11877	f	1,52	0,05	AI850266	258508	0610007L01Rik	RIKEN cDNA 0610007L01 gene
7583	t	1,55	0,08	AI426478	212039	Pld1	Phospholipase D1
15214	t	1,56	0,08	AI848202	192598	Phyhip	Phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein
5760	t	1,56	0,02	AI836867	688	Bag1	Bcl2-associated athanogene 1
2293	f	1,56	0,05	AI450835	251789	A130022J15Rik	RIKEN cDNA A130022J15 gene
11540	t	1,58	0,07	AI848270	121920	Sorl1	Sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing
12480	t	1,59	0,08	AI836697	300697	2310008M10Rik	RIKEN cDNA 2310008M10 gene
15237	t	1,61	0,00	AI850678	233860	2410066E13Rik	RIKEN cDNA 2410066E13 gene
9007	t	1,61	0,04	AA672203	296915	5730551F12Rik	RIKEN cDNA 5730551F12 gene
11424	t	1,62	0,06	Z29952			
8932	t	1,65	0,04	AI841851			
21380	t	1,66	0,05	AI426148	171300	4933424F08Rik	RIKEN cDNA 4933424F08 gene
9815	t	1,68	0,02	AI841344	300203	Ssh2	Slingshot homolog 2 (Drosophila)
9359	t	1,70	0,03	AI854299	273360	4933405A16Rik	RIKEN cDNA 5133401H06 gene
833	f	1,74	0,05	AI853881	326777	0610010K06Rik	RIKEN cDNA 0610010K06 gene
1245	t	1,75	0,02	AI836813	40748	C230026C11	Hypothetical protein C230026C11
22335	f	1,77	0,02	AI850603	133615	2810457I06Rik	RIKEN cDNA 2810457I06 gene
19330	t	1,80	0,07	AI848068	4173	Mtap1b	Microtubule-associated protein 1 B
14119	t	1,86	0,01	AI840794	260271	Surf5	Surfeit gene 5
19891	t	2,35	0,08	AI449281	242324	Sep 02	Septin 2

Hypothalamus CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
Spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**Accessison**	**Unigene cluster**	**Gensymbol**	**Genname**
15500	t	-2,73	0,01	AI413505			
12476	t	-2,68	0,02	AI413721	261602	Hic2	Hypermethylated in cancer 2
13997	t	-2,56	0,02	AI849259	290251	Cnbp1	Cellular nucleic acid binding protein 1
6292	t	-2,37	0,02	AI852932	28650	Rab6	RAB6, member RAS oncogene family
5667	t	-1,70	0,24	AA445087	256916	Sall4	Sal-like 4 (Drosophila)
19080	t	-1,64	0,02	AI850036			
4649	t	-1,61	0,02	AI846427	258010	Pgm2l1	Phosphoglucomutase 2-like 1
19551	t	-1,56	0,18	AA119918	290924	Zfp91	Zinc finger protein 91
4608	t	-1,56	0,02	AI846538			
20673	t	-1,53	0,05	AI846827	254267	Oxr1	Oxidation resistance 1
16491	t	-1,53	0,22	AI835942	8392	Trappc3	Trafficking protein particle complex 3
821	t	-1,50	0,19	AI425976	328835	E030034P13Rik	RIKEN cDNA E030034P13 gene
3353	t	-1,48	0,03	AI854274	261831	Bzw1	Basic leucine zipper and W2 domains 1
7167	t	-1,43	0,09	AI837982	297444	Arpp21	RIKEN cDNA 0710001E13 gene
18506	t	-1,43	0,20	AI465340	314113	Elovl6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)
15566	t	-1,43	0,16	AI451887	286868	Stxbp5	Syntaxin binding protein 5 (tomosyn)
12949	f	-1,38	0,03	AI851948			
20150	f	-1,31	0,02	AI848679	544	Pea15	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15
13372	f	-1,27	0,02	AA028557	45127	Cgref1	Cell growth regulator with EF hand domain 1
22075	f	-1,23	0,01	AI449992			
8722	f	-1,19	0,04	AI840384			
1089	f	-1,18	0,03	AA444790	8637	Spa17	Sperm autoantigenic protein 17
13956	f	-1,15	0,02	AI849989	30928	Slc25a12	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar), member 12
16007	f	-1,15	0,04	AI464529	276355	Slc34a1	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 1
9339	f	-1,13	0,02	AI390897	235283	Dpysl2	Dihydropyrimidinase-like 2
8745	f	1,08	0,02	AI842897			
18026	f	1,20	0,01	AI840610			
10231	f	1,24	0,01	AI451251	276155	Ihpk1	Inositol hexaphosphate kinase 1
8837	f	1,27	0,01	AA200002	271936	BC036961	CDNA sequence BC036961
3370	f	1,29	0,03	AI847573			
2755	f	1,30	0,04	AI449276	254642	Ctso	Cathepsin O
12410	f	1,35	0,01	AI118084	292637	Suclg2	Succinate-Coenzyme A ligase, GDP-forming, beta subunit
12672	f	1,35	0,01	AI846532	354720	Gnao1	Guanine nucleotide binding protein, alpha o
1472	f	1,35	0,04	AI413691	6890	Mageh1	Melanoma antigen, family H, 1
16922	t	1,42	0,19	AA183098	288602	Jarid1a	RIKEN cDNA D230014I24 gene
22995	t	1,43	0,17	Z27008			
16609	t	1,43	0,06	AA546582	21789	Dmgdh	Expressed sequence AW495222
2694	f	1,46	0,05	AI837046	97280		Transcribed locus
23092	t	1,47	0,20	AI852578	234608	Slc11a2	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2
16288	t	1,48	0,10	AI853124	39245		Transcribed locus
20455	t	1,55	0,20	AI327297	244820	Tbp	TATA box binding protein
1435	t	1,59	0,16	AI841889	209715	Col11a1	Procollagen, type XI, alpha 1
14177	t	1,70	0,20	AI427891	10909	Rhcg	Rhesus blood group-associated C glycoprotein

Hypothalamus CRH-R1$^{loxP/loxP}$ vs. CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKIIα-Cre							
Spot	**a2**	**f_reg**	**p_adj**	**Accessison**	**Unigene cluster**	**Gensymbol**	**Genname**
10499	t	1,73	0,12	AA967759	239698	A930031F18Rik	RIKEN cDNA A930031F18 gene
10294	t	1,88	0,25	AI451034	239566	D11Wsu47e	DNA segment, Chr 11, Wayne State University 47, expressed
4672	t	2,34	0,06	AI848407	2108	Ttr	Transthyretin
1480	t	2,43	0,02	AI847846	2108	Ttr	Transthyretin

6.2 Statistische Auswertung der qRT-PCR-Analysen

Die statistische Berechnungen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test (p-Wert links)und einem t-Test (p-Wert rechts) durchgeführt.

Spot	Accession	Genname	f_reg	p-Wert	
CRH-R1$^{-/-}$ Hippokampus					
1480	AI847846	transthyretin	-2,16	0,05	0,153
3353	NM_008963	prostaglandin-D2 synthase	-2,24	<0,001	0,000
3515	AI83735	transmembrane 4 sf 11	1,56	0,004	0,001
4186	AI839996	rap2 interacting protein	-1,26	0,001	0,006
4986	AI842958	FYVE and coiled-coil domain containing 1	3,38	<0,001	0,000
15359	AI841151	proteolipid protein	1,28	<0,001	0,000
16219	AI841101	aldolase 3, C isoform	-1,87	<0,001	0,000
CRH-R1$^{-/-}$ Hypophyse					
9724	AI847765	regulator of G-protein signaling 4	2,65	<0,001	0,000
14296	AI852254	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2	-1,27	0,001	0,000
CRH-R1$^{loxP/lox}$P CamKIIα-Cre Amygdala					
2049	AB093274	Unigene cluster cpeb3	-1,3	0,004	0,005
3185	AI853444	2610042L04Rik	-1,84	0,011	0,001
5167	AI413651	calsyntenin 3	-1,32	<0,001	0,000
11540	AI848270	Sortilin-related receptor	1,29	0,094	0,057
19080	AI850036	oxidation resistance 1	-1,84	<0,001	0,000
CRH-R1$^{loxP/lox}$P CamKIIα-Cre Hippokampus					
3185	AI853444	2610042L04Rik	-2,1	<0,001	0,000
11540	AI848270	Sortilin-related receptor	1,23	0,003	0,013
19080	AI850036	oxidation resistance 1	-1,77	<0,001	0,000

CRH-R1$^{loxP/loxP}$ CamKII-Cre	Hippokampus			Amygdala		
	f_reg	p-Wert		f_reg	p-Wert	
wt nicht-gestresst vs. wt gestresst	-1,66	<0,001	0,000	-1,58	0,004	0,001
ko nicht-gestresst vs. ko gestresst	1,07	0,387	0,492	2,07	<0,001	0,000
wt gestresst vs. ko gestresst	1,39	0,258	0,370	1,10	0,004	0,006

7 Literaturverzeichnis

Aggelidou E., Hillhouse E.W., Grammatopoulos D.K. (2002) Up-regulation of nitric oxide synthase and modulation of the guanylate cyclase activity by corticotropin releasing hormone but not urocortin II or urocortin III in cultured human pregnant myometrial cells. *Proc Natl Acad Sci U SA* **99**: 3300–3305.

Ahn A.H., Dziennis S., Hawkes R., Herrup K. (1994) The cloning of zebrin II reveals its identity with aldolase C. *Development* **120**: 2081–2090.

Aldenhoff J., Gruol D.L., Rivier J., Vale W., Siggins G.R. (1983) Corticotropin releasing factor decreases postburst hyperpolarizations and excites hippocampal neurons. *Science* **221**: 875–877.

Altar A.C., Laeng P., Jurata L.W., Brockman J.A., Lemire A., Bullard J., Bukhman Y.V., Young T.A., Charles V., Palfreyman M.G. (2004) Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways. *J Neurosci* **24**: 2667–2677.

Arborelius L., Owens M.J., Plotsky P.M., Nemeroff C.B. (1999) The role of corticotropin releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* **160**: 1–12.

Ashburner, Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genet* **25**: 25-29.

Aston C., Jiang L., Sokolov B.P. (2005) Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Molecular Psychiatry* **10**: 309-322.

Bale T.L., Contarino A., Smith G.W., Chan R., Gold L.H., Sawchenko P.E. (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* **24**: 410–414.

Bartel P. L, Chien C.T., Sternglanz R., Fields S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques* **14**: 920–924.

Bauer M, Whybrow PC. (2001) Thyroid hormone, neural tissue and mood modulation. *World J Biol Psych* **2**: 57–67.

Bauer M., Heinz A., Whybrow P. C. (2002) Thyroid hormones, serotonin and mood: of synergy and significance in the adult brain. *Mol Psychiatry* **7**: 140–156.

Bayatti N., Zschocke J., Behl C. (2003) Brain region-specific neuroprotective action and signaling of corticotropin-releasing hormone in primary neurons. *Endocrinology* **144**: 4051–4060.

Bayatti N., Behl C. The neuroprotective actions of corticotropin releasing hormone. *Ageing Research Reviews* **4**: 258–270.

Berardini T.Z., Drygas-Williams M., Callard G.V., Tolan D.R. (1997) Identification of neuronal isozyme specific residues by comparison of goldfish aldolase C to other aldolases. *Comp Biochem Physiol* **117A**: 471– 476.

Beuckmann C.T., Lazarus M., Gerashchenko D., Mizoguchi A., Nomura S., Mohri I., Uesugi A., Kaneko T., Mizuno N., Hayaishi O., Urade Y. (2000) Cellular localization of lipocaline-type prostaglandin D synthase (b-trace) in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* **428**: 62–7.

Beuckmann, C.T., Aoyagi, M., Okazaki, I., Hiroike, T., Toh, H., Hayaishi, O., Urade, Y. (1999) Binding of biliverdin, bilirubin, and thyroid hormones to lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochemistry* **38**: 8006-8013.

Berridge M.J. (1994) The biology and medicine of calcium signalling. *Mol Cell Endocrinol* **98**: 119-124.

Bezchlibnyk Y., Young L.T (2002) The neurobiology of bipolar disorders: focus on signal transduction pathways and the regulation of gene expression. *Can J Psych* **2**: 135-145.

Bezchlibnyk Y.B., Wang J.F., McQueen G.M., Young L.T. (2001): Gene expression differences in bipolar disorder revealed by cDNA array analysis of post-mortem frontal cortex. *J Neurochem* **79**: 826–834.

Bishop G.A. (2002) Development of a corticotropin-releasing factor mediated effect on the firing rate of Purkinje cells in the postnatal mouse cerebellum. *Exp Neurol* **178**: 165–174.

Bittencourt J.C., Sawchenko P.E. (2000) Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors? An analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *J Neurosci* **20**: 1142-1156.

Blank T., Nijholt I., Eckart K., Spiess J. (2002) Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: implications for hippocampus-dependent learning. *J Neurosci* **22**: 3788–3794.

Blank T., Nijholt I., Grammatopoulos D.K., Randeva H.S., Hillhouse E.W., Spiess J. (2003) Corticotropin-releasing factor receptors couple to multiple G-proteins to activate diverse

intracellular signaling pathways in mouse hippocampus: role in neuronal excitability and associative learning. *J Neurosci* **23**: 700–707.

Bongarzone E. R, Campagnoni C. W., Kampf K., Jacobs E. C., Handley V. W., Schonmann V. et al. (1999) Identification of a new exon in the myelin proteolipid protein gene encoding novel protein isoforms that are restricted to the somata of oligodendrocytes and neurons. *J. Neurosci.* **19**: 8349-57.

Boison D., Büssow H., D'Urso D., Müller H.-W. and Stoffel W. (1995) Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths. *J. Neurosci.* **15**: 5502–5513.

Bosse F., Hasse B., Pippirs U., Greiner-Petter R., Müller H.-W. (2003) Proteolipid plasmolipin: localization in polarized cells, regulated expression and lipid raft association in CNS and PNS myelin. *J Neurochem* **86**: 508–518.

Brar B.K., Perrin M.H., Vale W.W. (2003) CRF Receptor Signaling. *Encyclopaedia of Hormones, Academic Press.* **1**: 313-325.

Brar B.K., Jonassen A.K., Stephanou A., Santilli G., Railson J., Knight R.A., Yellon D.S., Latchman D.S. (2000) Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPKdependent pathway. *J Biol Chem* **275**: 8505-8514.

Brown, G. W., Bifulco, A., and Harris, T. O. (1987). Life events, vulnerability and onset of depression: some refinements. *Br J Psychiatry* **150**: 30-42.

Buwalda, B., de Boer, S.F., Van Kalkeren, A.A., Koolhaas, J.M. (1997) Physiological and behavioral effects of chronic intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing factor in the rat. *Psychoneuroendocrinology* **22**: 297–309.

Cain B.M., Wang W.G., Beinfeld M.C. (1997) Cholecystokinin (CCK) levels are greatly reduced in the brains but not the duodenums of Cpe(*fat*)/Cpe(*fat*) mice: a regional difference in the involvement of carboxypeptidase E (Cpe) in pro-CCK processing. *Endocrinology* **138**: 4034–4037.

Cabrera-Vera T.M., Vanhauwe J., Thomas T.O., Medkova M., Preininger A., Mazzoni M.R., Hamm H.E. (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* **24**: 765–781.

Callebaut J., de Gunzburg J, Goud B., Mornon J.-P. RUN domains: a new family of domains involved in Ras-like GTPase signaling. *Trends Biochem Sci* **26**: 79-83.

Cameron H. A., McEwen B. S., Gould E. (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* **15**: 4687–4692.

Cantarella G., Lemperuer L., Lombardo G., Chiarenza A., Pafumi C., Zappala G., Bernardini R. (2001) Divergent effects of corticotropin releasing hormone on endothelial cell nitric oxide synthase are associated with different expression of CRH type 1 and 2 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **134**: 837–844.

Canete-Soler R., Reddy K.S., Tolan D.R., Zhai J. (2005) Aldolases A and C Are Ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *J Neurosci* **25**: 4353– 4364

Cawley N., Zhou J., Hill J.M., Abebe D., Romboz S., Yanik T., Rodriguez R.M., Wetsel W.C., Loh Y.P. (2004) The varboxypeptidase EkKnockout mouse exhibits endocrinological and behavioral deficits. *Endocrinology* **145**: 5807–5819.

Chalmers D.T., Lovenberg T.W., De Souza E.B. (1995) Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* **15**: 6340-6350.

Chalmers D.T., Lovenberg T.W., Grigoriadis D.E., Behan D.P., De Souza E.B. (1996) Corticotropin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. *Trends Pharmacol Sci* **17**: 166–172.

Chan R. S., Huey E. D., Maecker H. L., Cortopassi K. M., Howard S. A., Iyer A. M., McIntosh L. J., Ajilore O. A., Brooke S. M., Sapolsky R. M. (1996) Endocrine modulators of necrotic neuron death. *Brain Pathol.* **6**: 481–491.

Chen Y., Brunson K.L., Adelmann G., Bender R.A., Frotscher M., Baram T.Z. (2004) Hippocampal corticotropin releasin hormone : pre- and postsynaptic location and release by stress. *Neurosci* **126**: 533-540.

Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-9.

Chrousos G.P. (1998) Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann NY Acad Sci* **851**:311 – 35.

Cibelli G., Corsi P., Diana G., Vitiello F., Thiel G. (2001) Corticotropin-releasing factor triggers neurite outgrowth of a catecholaminergic immortalized neuron via cAMPand MAP kinase signaling pathways. *Eur J Neurosci* **13**: 1339–1348.

Claing A., Laporte S.A., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and β-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* **66**: 61–79.

Clapham D.E., and E.J. Neer. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 167–203.

Colas P., Brent R. (1998) The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**: 355–363.

Collinge J. and Curtis D. (1991) Decreased hippocampal expression of a glutamate receptor gene in schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* **159**: 857–859.

Cool D.R., Fenger M., Snell C.R., Loh Y.P. (1995) Identification of the sorting signal motif within pro-opiomelanocortin for the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* **270**: 8723-8729.

Cool D.R., Normant E., Shen F., Chen H.C., Pannell L., Zhang Y., Loh Y.P. (1997) Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor. *Cell* **88**: 73–83**.**

Cool D.R., Loh Y.P. (1998) Carboxypeptidase E is a sorting receptor for prohormones. *Endocrinol* **139**: 7–13.

Coste S.C., Kesterson R.A., Heldwein K.A., Stevens S.L., Heard A.D., Hollis, J.H. (2000) Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking CRH receptor-2. *Nat Genet* **24**: 403–409.

Cotter D.R., Pariante C.M., Everall I.P. (2001) Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res Bull* **55**: 585–595.

Craighead M. W., Boutin H., Middlehurst K. M., Allan S. M., Brooks N., Kimber I. and Rothwell N. J. (2000) Influence of corticotrophin releasing factor on neuronal cell death in vitro and in vivo. *Brain Res* **881**: 139-43.

Datson N.A., van der Perk J., de Kloet E.R., Vreugdenhil E. (2001) Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *European J Neurosci* **14**: 675-689.

Datson N.A., van Perk J., de Kloet E.R., Vreugdenhil E. (2001) Expression profile of 30,000 genes in rat hippocampus using SAGE. *Hippocampus* **11**: 430-44.

Datson N.A., Meijer L., Steenbergen P.J., Morsink M.C., van der Laan S., Meijer O.C., de Kloet E. R. (2004) Expression profiling in laser-microdissected hippocampal subregions in rat brain reveals large subregion-specific differences in expression. *European J Neurosci* **20**: 2541–2554.

Dautzenberg F.M., Braun S., Hauger R.L. *et al.* (2001) GRK3 mediates desensitization of CRF1 receptors: a potential mechanism regulating stress adaptation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**: R935–R946.

Dautzenberg F.M., Wille S., Braun S., Hauger R.L. (2002) GRK3 regulation during CRF- and urocortin-induced CRF1 receptor desensitization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **298**: 303–308.

Davis M. (1992) The role of the amygdala in conditioned fear. In The Amygdala. Edited by Aggleton JP. *New York: Wiley-Liss*: 255-306.

Davis K.L., Mohs R.C., Marin D.B., Purohit D.P., Perl D.P., Lantz M., Austin G., Haroutunian V. (1999) Neuropeptide abnormalities in patients with early Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* **56**: 981–987.

Deak T., Nguyen K.T., Ehrlich A.L., Watkins L.R., Spencer R.L., Maier S.F., Licinio J., Wong M.L., Chrousos G.P., Webster E., Gold P.W. (1999) The impact of the nonpeptide corticotropin-releasing hormone antagonist antalarmin on behavioral and endocrine responses to stress. *Endocrinology* **140**: 79– 86.

De Kloet E.R., Rosenfeld P., Van Eekelen J.A., Sutanto W., Kang H. (1988) Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res* **73**: 101–120.

De Kloet E.R. (1995) Steroids, stability and stress. *Front Neuroendocrinol* **16**: 416-25.

Dermitzaki E., Tsatsanis C., Gravanis A., Margioris A. N. (2002) Corticotropin releasing hormone (CRH) induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 MAPK. *J Biol Chem.* **277**: 12280–12287.

Dhanvantari und Loh, (2000) Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *J Biol Chem* **275**: 29887-93.

Dickson P.W., Aldred A.R., Marley P.D., Bannister D., Schreiber G. (1986) Rat choroid plexus specializes in the synthesis and secretion of transthyretin (prealbumin): Regulation of transthyretin synthesis in choroid plexus is independent from that in liver. *J Biol Chem* **261**: 3475-3478.

Donaldson C.J., Sutton S.W., Perrin M.H., Corrigan A.Z., Lewis K.A., Rivier, J.E., et al. (1996) Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology* **137**: 2167–2170.

Drevets W.C. (2000) Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Prog Brain Res* **126**: 413–431.

Dunn A.J. and Berridge C.W. (1990) Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Rev* **15**: 71–100.

Dunner D. L., Patrick V., Fieve, R. R. (1979) Life events at the onset of bipolar affective illness. *Am J Psychiatry* **136**: 508-511.

Elliott-Hunt C.R., Kazlaukaite J., Wilde G.J., Grammatopoulos D.K., Hillhouse E.W. (2002) Potential signalling pathways underlying corticotropin releasing hormone's mediated neuroprotection from excitotoxicity in rat hippocampus. *J Neurochem* **80**: 416-25.

Engeholm M. (2002) Identifizierung von Proteinen, die an die carboxyterminale zytoplasmatische Domäne des CRF_1-Rezeptors binden, und biochemische Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen dem CRF1-Rezeptor und PSD-95. *Dissertation an der medizinischen Fakultät München*.

Eriksson P. S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A. M., Nordborg, C. Peterson D. A., Gage F. H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4:** 1313–1317.

Evans S.J., Datson N.A., Kabbaj M., Thompson R.C., Vreugdenhil E., De Kloet R.E., Watson S.J., Akil H. (2002) Evaluation of Affymetrix Gene Chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. *European J Neurosci* **16**: 409-415.

Evans S.J., Choudary P.V., Neal C.R., Li J.Z.,Vawter M.P., Homita H., Lopez J.F., Thompson R.C., Meng F., Stead J.D., Walsh D.M., Myers R.M., Bunney W.E., Watson S.J.E., Jones G., Akil H. (2004) Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression. *Proc Natl Acad Sci USA* **26**: 15506–15511.

Feldman S.N., Conforti N., Weidenfeld J. (1995) Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci. Biobehav. Rev*. **19:** 235–240.

Fields S., Song, O.-K. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245–246.

Fischer H., Zhang X. U., O'Brien K. P., Kylsten P., Engvall E. (2001) C7, a novel nucleolar protein, is the mouse homologue of the Drosophila late puff product L82 and an isoform of human OXR1. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 795–803.

Fitzgerald M.L., Reed G.L., Rab6 is phosphorylated in thrombinactivated platelets by a protein kinase C-dependent mechanism: effects on GTP/GDP binding and cellular distribution. *Biochem J* **342**: 353– 360.

Flower D.R. (1996) The lipocaline protein family: structure and function. *Biochem J* **318**:1–14

Fox M. W., Anderson R. E., Meyer F. B. (1993) Neuroprotection by corticotrophin releasing hypoxia in rat brain. *Stroke* **24**: 1072-1076.

Fox E.A., Gruol D.L. (1993) Corticotropin-releasing factor suppresses the afterhyperpolarization in cerebellar Purkinje neurons. *Neurosci Lett* **149**: 103–107.

Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* **51**: 319–351

Fricker L. D., Berman Y. L., Leiter E. H., Devi L. A. (1996) Carboxypeptidase E activity is deficient in mice with the fat mutation. *J Biol Chem* **271**: 30619–30624.

Fuchs E., Gould E. Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications. *Eur J Neurosci* **12**: 2211-2214.

Fuss B., Baba H., Phan T., Tuohy V.K., Macklin W.B. (1997) Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *J Neurosci* **17**: 9095–9103.

Gaborik Z., Hunyady L. (2004) Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* **15**: 286-293.

Garavaglia S., D'Angelo I., Emanuelli M., Carnevali F., Pierella F., Magni G., Rizzi, M. (2001) Structure of human NMN adenylyltransferase: a key nuclear enzyme for NAD homeostasis. *J Biol Chem* **277**: 8524–8530.

García-Fernández L.F., Iñiguez M.A., Eguchi N., Fresno M., Urade Y., Muñoz A. (2000) Dexamethasone Induces Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase Gene Expression in Mouse Neuronal Cells. *J Neurochem* **75**: 460-466.

Geschwind D., Ou J., Easterday M., Dougherty J., Jackson R., Chen Z., Antoine H., Terskikh A., Weissman I., Nelson S. (2001) A genetic analysis of neural progenitor differentiation. *Neuron* **29**: 325–339.

Giacomelli S., Leone M.G., Grima J., Silvestrini B., Cheng C.Y. (1996) Astrocytes synthesize and secrete prostaglandin D synthetase in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1310**: 269–276.

Gillen C., Gleichmann M., Greiner-Petter R., Zoidl G., Kupfer S., Bosse F., Auer J., Müller H. W. (1996) Full-length cloning, expression and cellular localization of rat plasmolipin mRNA, a proteolipid of PNS and CNS. *Eur J Neurosci* **8**: 405–414.

Gillooly D.J., Simonsen A., Stenmark A. (2001) Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem J* **355**: 249-258.

Ginsberg S. D., Hemby S. E., Lee V. M., Eberwine J. H., Trojanowski J. Q. (2000) Expression profile of transcripts in Alzheimer's disease tangle-bearing CA1 neurons. *Ann. Neurol.* **48**: 77–87.

Ginsberg, S. D., Hemby S. E., Lee V. M., Eberwine J. H., Trojanowski J. Q. (1999) Predominance of neuronal mRNAs in individual Alzheimer's disease senile plaques. *Ann Neurol* **45**: 174–181.

Gold P.W., Drevets W.C., Charney D.S., (2002) New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression. *Biol Psychiatry* **52**: 381–385.

Gold P.W., Chrousos G.P. (2002) Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high *vs* low CRH/NE states. *Molecular Psychiatry* **7**: 254–275.

Gow A., Southwood C. M. and Lazzarini R. A. (1998) Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocyte apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* **140:** 925–934.

Grammatopoulos D.K., Milton N.G., Hillhouse E.W. (1994) The human myometrial CRH receptor: G proteins and second messengers. *Mol Cell Endocrinol* **99**: 245–250.

Grammatopoulos D.K., Dai Y., Randeva H. S., Levine M. A., Karteris E., Easton A. J., Hillhouse E. W. (1999) A novel spliced variant of the type 1 corticotropinreleasing hormone receptor with a deletion in the seventh transmembrane domain present in the human pregnant term myometrium and fetal membranes. *Mol Endocrinol* **13**: 2189–2202.

Grammatopoulos D.K., Chrousos G.P. (2002) Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinology & Metabolism* 13: 436-444.

Grammatopoulos D.K., Randeva H.S., Levine M.A., Katsanou E.S., Hillhouse E.W. (2000) Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1alpha and R2beta CRH receptor subtypes and stimulation of Gqproteins. *Mol Endocrinol* **14**: 2076–2091.

Gray T.S. (1990) The organization and possible function of amygdaloid corticotropin-releasing factor pathways. In Corticotropin-Releasing Factor: Basic and Clinical Studies of a Neuropeptide. Edited by De Souza EB, Nemeroff CB. Boca CB. Boca Raton, Florida: *CRC Press*: 53-68.

Griffiths I., Klugmann M., Anderson T., Yool D., Thomson C., Schwab M. H. et al. (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* **280:**1610–1613.

Groenink L., Dirks A., Verdouw P.M., Schipholt M., Veening J.G. (2002) HPA axis dysregulation in mice overexpressing corticotropin releasing hormone. *Biol Psychiatry* **51**: 875–881.

Guest P.C., Ravazzola M., Davidson H.W., Orci L., Hutton J.C. (1991) Molecular heterogeneity and cellular localization of carboxypeptidase H in the islets of Langerhans. *Endoc* **129**: 734-740.

Haass N.K., Kartenbeck M.A., Leube R.E. (1996) Pantophysin is a ubiquitously expressed synaptophysin homologue and defines constitutive transport vesicles. *J Cell Biol* **134**: 731–746.

Hagen G. A., Elliott W. J. (1973) Transport of thyroid hormones in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Endocrinol* 37: 415–422.

Hakak Y., Walker J.R., Li C., Wong W.H., Davis K.L., Buxbaum J.D., Haroutunian V., Fienberg A. A. (2001)Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4746–4751.

Hamidi M., Drevets W.C., Price J.L. (2004) Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes. *Biol Psychiatry* **55**: 563–569.

Hammen C., Davila J., Brown G., Ellicott A., Gitlin M. (1992) Psychiatric history and stress: predictors of severity of unipolar depression. *J Abnorm Psychol* **101**: 45-52.

Hauger R.L. and Dautzenberg F.M. (1999) Regulation of the stress response by corticotropin releasing factor receptors. In *Neuroendocrinolog in Physiology and Medicine* (Conn, P.M. and Freedman, M.E., eds) Humana Press: 261–286.

Hauger R.L., Dautzenberg F.M., Falccus A., Liepold T., Spiess J. (1997) Regulation of CRF receptor function in human Y-79 retinoblastoma cells: rapid and reversible homologous desensitization but prolonged recovery. *J Neurochem* **68**: 2308–2316.

Heinrichs S.C., Lapansky J., Lovenberg T.W., De Souza E.B., Chalmers D.T. (1997) Corticotropin-releasing factor CRF1, but not CRF2, receptors mediate anxiogenic-like behavior. *Regul Pept* **71**:15-21.

Hendriksen H., Katson N.A., Ghijesen W., van Vilet E.A., da Silva F., Gorter J.A., Vreugdenhil E. (2001) Altered hippocampal gene expression prior to the onset of spontaneous seizures in the rat post-status epilepticus model. *Eur J Neurosci* **14**: 1475–1484.

Herman J.P. and Cullinan E. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* **20:** 78–83.

Hermans E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **99**: 25-44.

Hill R. M., Ledgerwood E.C., Brennan S.O., Pu L.-P., Loh Y. P., Christie D. L., Birch N. P. (1995) Comparison of the Molecular Forms of the Kex2/Subtilisin-Like Serine Proteases SPC2, SPC3, and Furin in Neuroendocrine Secretory Vesicles Reveals

Differences in Carboxyl-Terminus Truncation and Membrane Association. *J Neuroch* **65**: 2318-2326.

Hintsch G.,1 A. Zurlinden A., Meskenaite V, Steuble M., Fink-Widmer K., Kinter J., Sonderegger P. (2002) The calsyntenins—a family of postsynaptic membrane proteins with distinct neuronal expression patterns. *Molecular and Cellular Neuroscience* **21**: 393–409.

Hofmann C., Mikhail Shepelev M., Chernoff J. (2004) The genetics of Pak. *J Cell Sci* **117**: 4343-4354.

Hollrigel G.S., Chen K., Baram T.Z., Soltesz I. (1998) The proconvulsant actions of corticotropin-releasing hormone in the hippocampus of infant rats. *Neurosci* **84**: 71-79.

Holsboer, F. (2001). Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* **62**: 77-91.

Hsu S., Hsueh A. (2001) Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* **7**: 605–611.

Hübner K., Windhoffer R., Hutter H., Leube R.E. (2002) Tetraspan vesicle membrane proteins: synthesis, subcellular localization, and functional properties. *Int Rev Cyto* **214**: 103–159.

Imaki T., Katsumata H., Miyata M., Naruse M., Imaki I., Inami S. (2001) Expression of corticotropin-releasing factor, urocortin andcorticotropin-releasing factor type 1 receptors in hypothalamic-hypophyseal systems under osmotic stimulation. *J Neurendocrinol* **13**: 328–338.

Imaki T., Katsumata H., Konishi S.L., Kasagi Y., Minami S. (2003) Corticotropin-releasing factor type-1 receptor mRNA is not induced in mouse hypothalamus by either stress or osmotic stimulation. *J Neuroendocrinol* **15**: 916-24.

Irwin L.N. (2001) Gene expression in the hippocampus of behaviorally stimulated rats: analysis by DNA microarray. *Brain Res Mol Brain Res* **96**: 163-169.

Iwamoto K., Kakiuchi C., Bundo M., Ikeda K., Kato T. Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. *Mol Psychiatry* **9**: 406-416.

Jacobson L., Sapolsky R.M. (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Rev* **12:** 118–134.

Jacobsen L., Madsen P., Jacobsen C., Nielsen M.S., Gliemann J., Petersen C.M. (2001) Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chemi* **276**: 22788–22796.

Janoueix-Lerosey I., De Tand M.-F., Tavitian A., De Gunzburg J. (1998) Identification of a specific effector of the small GTP-binding protein Rap2. *Eur J Biochem* **252**: 290–298

Kagamiishi Y., Yamamoto T., Watanabe S., Hippocampal serotonergic system is involved in anxiety-like behavior induced by corticotropin-releasing factor. *Brain Res* **991**: 212-21.

Kaifu T., Nakahara J., Inui M., Mishima K., Momiyama T., Kaji M. (2003) Osteopetrosis and thalamic hypomyelinosis with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J Clin Invest* **111**: 323–332.

Kamme F., Salunga, R., Yu J., Tran D.T., Zhu J., Luo L., Bittner A., Guo H.Q., Miller N., Wan J., Erlander, M. (2003) Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity. J Neurosci **23**: 3607–3615.

Kanaki T., Bujo H., Hirayama S., Tanaka K., Yamazaki H., Semiya K., Morisaki N., Schneider W.J., Saito Y. (1998) Developmental regulation of LR11 expression in murine brain. *DNA Cell Biol.* **17**: 647–657.

Kasckow J.W., Baker D., Geracioti T.D., Jr. (2001) Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic disorder. *Peptides* **22**: 845-851.

Kiang, J.G. (1997) Corticotropin-releasing factor-like peptides increase cytosolic [Ca2] in human epidermoid A-431 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **329**: 237–244.

Kino T., Tiulpakov A., Ichijo T., Chheng L., Kozasa T., Chrousos G.P. (2005) G protein beta 2 interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *J Cell Biol* **169**: 885–896.

Kishimoto T., Radulovic J., Radulovic M., Lin C.R., Schrick C., Hooshmand F., (2000) Deletion of corticotropin-releasing hormone receptor-2 reveals an anxiolytic role for corticotropinreleasing hormone receptor-2. *Nat Genet* **24**: 415–419.

Kokoeva M.V., Yin H., Flier J.S. (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* **310**: 679-83.

Kolch W. (2003) Erbin: Sorting Out ErbB2 Receptors or Giving Ras a Break? *Sci STKE* **199**: 37.

Konishi S., Katsumata H., Kasagi Y., Minami S., Imaki T. (2003) Regulation of corticotropin-releasing factor (CRF) type-1 receptor gene expression by CRF in the hypothalamus. *Endocr J* **50**: 21–36.

Korte, S.M. (2001) Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* **25**: 117–142.

Kostic T.S., Andric S.A., Maric D., Kovacevic R.Z. (2001) Spontaneous and receptor-controlled soluble guanylyl cyclase activity in anterior pituitary cells. *Mol Endocrinol* **15**: 1010–1022

Kovalovsky D., Refojo D., Liberman A. C., Hochbaum D., Pereda M. P., Coso O. A., Stalla G. K., Holsboer F., Arzt, E. (2002) Activation and Induction of NUR77/NURR1 in Corticotrophs by CRH/cAMP: Involvement of Calcium, Protein Kinase A, and MAPK Pathways. *Mol Endocrino* **16:** 1638–1651.

Farber K., Kettenmann H. (2005) Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev* **48**: 133-143.

Kumar A., Thomas A., Lavretsky H., Yue K., Huda A., Curran J. (2002) Frontal white matter biochemical abnormalities in late-life major depression detected with proton magnetic resonance spectroscopy. *Am J Psychiatry* **159**: 630–636.

Lacourse K.A, Friis-Hansen L Rehfeld J.F., Samuelson L.C. (1997) Disturbed progastrin processing in carboxypeptidase E-deficient *fat* mice. *FEBS Lett* **416**: 45–50.

Lacourse K.A, Friis-Hansen L., Samuelson L.C., Rehfeld J.F. (1998) Altered processing of procholecystokinin in carboxypeptidase E-deficient *fat* mice: differential synthesis in neurons and endocrine cells. *FEBS Lett* **436**: 61–66.

Laugwitz K.-L., Allgeier A., Offermanns S., Spicher K., van Sande J., Dumont J.E., Schultz G. (19969 The human thyrotropin receptor: A heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 116-120.

Leberhz H.G., Rutter W.J. (1969) Distribution of fructose diphosphate aldolase variants in biological systems. *Biochemistry* **8**: 109 –121.

Lee C. K., Weindruch R., Prolla T. A. (2000) Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nature Genet* **25**: 294–297.

Levitt, P., Barbe, M. F. & Eagleson, K. L. (1997) Patterning and specification of the cerebral cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* **20,** 1–24.

Lewohl J. M., Wixey J., Harper C.G., Dodd P.R. (2000) Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res* **24**: 1873–1882.

Lezoualc'h, F., Engert, S., Berning, B., Behl, C., (2000) Corticotropin-releasing hormone-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with the increased release of non-amyloidogenic amyloid beta precursor protein and with the suppression of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* **14**: 147–159.

Li D., Roberts R. (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**: 2085-97.

Liang X., Liejun Wu L., Hand T., Andreasson K. (2005) Prostaglandin D2 mediates neuronal protection via the DP1 receptor. *J Neurochem* **92**: 477–486.

Liebsch G., Landgraf R., Gerstberger R., Probst J.C., Wotjak C.T., Engelmann M., Holsboer F., Montkowski A. (1995) Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. *Regul Pept* **59**: 229-239.

Liebsch G., Landgraf R., Engelmann M., Lörscher P., Holsboer F. (1999) Differential behavioural effects of chronic infusion of CRH 1 and CRH 2 receptor antisense oligonucleotides into the rat brain. *J Psychiatr Res* **33**: 153-163.

Liu J., Yu B., Neugebauer V., Grigoriadis D.E., Rivier J., Vale W.W., Shinnick-Gallagher P., Gallagher J.P. (2004) Corticotropin-Releasing Factor and Urocortin I Modulate Excitatory Glutamatergic Synaptic Transmission. *J Neurosci* **24**: 4020–4029.

Livak K.J., Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402-408.

Livesey F.J., Furukawa T., Steffen M.A., Church G.M., Cepko C.L. (2000) Microarray analysis of the transcriptional network controlled by the photoreceptor homeobox gene Crx. *Curr Biol* **10**: 301–310.

Luo Z. and Geschwind D.H. (2001) Microarray applications in neuroscience. *Neurobiol Dis* **8**: 183–193.

Lovenberg, T.W., Chalmers D.T., Lin C., DeSouza E.B. (1995) CRF2 alpha and CRF2beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* **136**: 4139–4142.

Lovenberg T.W., Liaw C.W., Grigoriadis D.E., Clevenger W., Chalmers D., De Souza E.B. and Oldersdorf T. (1995) Cloning and characterisation of a functionally distinct corticotrophin releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 836-840.

Lundkvist J., Chai Z., Teheranian R., Hasanvan H., Bartfai T., Jenck F., Widmer U., Moreau J.L. (1996) A non-peptidic corticotropin releasing factor receptor antagonist attenuates fever and exhibits anxiolytic-like activity. *Eur J Pharmacol* **309**: 195– 200.

Luo Z., Geschwind D.H. (2001) Microarray Applications in Neuroscience. *Neurobiology of Disease* **8**: 183–193.

Luo L., Salunga R.C., Guo H., Bittner A., Joy K.C., Galindo J.E., Xiao H., Rogers K.E., Wan J.S., Jackson M.R., Erlander M.G. (1999) Gene-expression profiles of laser-captured adjacent neuronal sub-types. *Nature Med.* **5**: 117–122.

Lyons M.K., Anderson R.E. and Meyer F.B. (1991) Corticotrophin releasing factor antagonist reduces ischemic hippocampal neuronal injury. *Brain Res* **545**: 339-342.

Madtes Jr. P., Lee K.H., King J.S., Burry R.W. (2004) Corticotropin releasing factor enhances survival of cultured GABAergic cerebellar neurons after exposure to a neurotoxin. *Brain Res Dev Brain Res* **151**: 119–128.

Maecker H., Desai A., Dash R., Rivier J., Vale W. and Sapolsky R. (1997) Astressin, a novel and potent CRF antagonist, is neuroprotective in the hippocampus when administered after a seizure. *Brain Res* **744**: 166-170.

Mahon M.J., Shimada M (2005) Calmodulin interacts with the cytoplasmic tails of the parathyroid hormone 1 receptor and a sub-set of class b G-protein coupled receptors. *FEBS Lett* **579**: 803-7.

Mahon M.J., Tabetha M. Bonacci T.M., Paola Divieti P., Smrcka A.V. (2005) A docking site for G protein βγ subunit on the parathyroid hormone 1 receptor supports signaling through multiple pathways. *Mol Endocrinol*: epub.

Makrigiannakis A., Zoumakis E., Kalantaridou S., Coutifaris C., Margioris A.N., 1, Coukos G., Rice K.C., Gravanis A., G. P. Chrousos G.P. (2001) Corticotropinreleasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol* **2**: 1018–1024.

May C., Rapoport S.I., Tomai T.P., Chrousos G.P., Gold P.W. (1987) Cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing hormone (CRH) and corticotropin (ACTH) are reduced in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* **37**: 535–538.

Mayberg H.S. (1997) Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **9**: 471– 481.

McEwen B.S. (2000) Effects of Adverse Experiences for Brain Structure and Function. *Biol Psychiatry* **48**: 721–731.

McConnell, S. K. (1995) Strategies for the generation of neuronal diversity in the developing central nervous system. *J Neurosci* **15:** 6987– 6998.

Mei B., Li C., Dong S., Jiang C.W., Wang H., Hu Y. (2005) Distinct gene expression profiles in hippocampus and amygdala after fear conditioning. *Brain Res Bull* **67**: 1-12.

Michajlovskij N., Lichardus B., Kvetnanski R., Ponec J. (1988) Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake, urine output and vasopressin changes in rats. *Endocrinol Exp* **22**: 143-157.

Minichiello L., Korte M., Wolfer D., Kühn R., Unsicker K., Cestari V., Rossi-Arnaud C., Lipp H.-P., Bonhoeffer T., Klein R. (1999) Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* **24**: 401-414.

Mirnics K., Middleton A.M., Lewis D.A., Levitt P. (2000) Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* **28**, 53–67.

Mirnics K., Middleton F.A., Stanwood G.D., Levis D.A., Levitt P. (2001) Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry* **6**: 293–301.

Mirnics K., Pevsner J. (2005) Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease. *Nat Neurosci* **7**: 434-439.

Mitra A., Song L., Fricker L.B. (1994) The C-terminal region of carboxypeptidase E is involved in membrane binding and intracellular routing in AtT-20 cells. *J Biol Chem* **268**: 19876-19881.

Miyata M., Okada D., Hashimoto K., Kano M., Ito M. (1999) Corticotropin releasing factor plays a permissive role in cerebellar long-term depression. *Neuron* **22**: 763–775.

Miyata I., Shiota C., Ikeda Y., Oshida Y., Chaki S., Okuyama S., Inagami T. Cloning and characterization of a short variant of the corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat amygdala. *Biochem Biophys Res Commun* **256**: 692– 696.

Motoi Y., Aizama T., Haga S., Nakumura S., Namba Y., Ikeda K. (1999) Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Res* **833**: 209-215.

Mouradian M.M., Farah Jr. J.M., Mohr E., Fabbrini G., O'Donohue T.L., Chase T.N. (1986). Spinal fluid CRF reduction in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **8**: 393–400.

Müller M. B., Zimmermann S., Sillaber, I., Hagemeyer T.P., Deussing J.M., Timpl P., Kormann M.S., Droste S.K., Kuhn R., Reul J.M*., et al.* (2003). Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat Neurosci* **6:** 1100-1107.

Naggert J.K., Fricker L.D., Varlamov O., Nishina P.M., Rouille Y., Steiner D.F., Carroll R.J., Paigen B. J., Leiter E. H. (1995) Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated

with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet* **10:** 135–142.

Nestler E.J, Barrot M., DiLeone R.J., Eisch A.J., Gold S.J., Lisa M. Monteggia L.M. (2002) Neurobiology of Depression. *Neuron* **34**: 13–25.

Ni Y., Gold S.J., Iredale P.A, Terwilliger R.Z., Ronald S. Duman R.S., E.J. Region-Specific Regulation of RGS4 (Regulator of G-Protein-Signaling Protein Type 4) in Brain by Stress and Glucocorticoids: *In Vivo* and *In Vitro* Studies. *J Neurosci* **19**: 3674-3680.

Nisenbaum L. K. (2002) The ultimate chip shot: Can microarray technology deliver for neuroscience? *Genes Brain Behav* **1**: 27–34.

O'Brien J., Ames D., Chiu E., Schweitzer I., Desmond P., Tress B. (1998) Severe deep white matter lesions and outcome in elderly patients with major depressive disorder: follow up study. *BMJ* **317**: 982–984.

Ogden C.A., Rich M.E., Schork N.J., Paulus M.P., Geyer M.A., Lohr J.B., Kuczenski R., Niculescu A.B. (2004) Candidate genes, pathways and mechanisms for bipolar (manic-depressive) and related disorders: an expanded convergent functional genomics approach. *Mol Psychiatry* **9**: 1007-1029.

Ohba Y., Mochizuki N., Matsuo K., Yamashita S., Nakaya M., Hashimoto Y., Hamaguchi M., Kurata T., Nagashima K., Matsuda M. Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade. *Mol Cell Biol* **20**: 6074-6083.

Okuyama S., Chaki S., Kawashima N., Suzuki Y., Ogawa S., Nakazato A., Kumagai T. (1999) Receptor binding behavioral, and electrophysiological profiles of nonpeptide corticotropin-releasing factor subtype 1 receptor antagonists CRA1000 and CRA1001. *J Pharmacol Exp Ther* **289**: 926–935.

Oldfield E.H., McCann S.M., Gold P.W., (2000) Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropinreleasing hormone. *Proc Natl Acad Sci* USA **97**: 325–330.

Owens M., Nemeroff C.B. (1991) Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev* **43**: 425–473.

Pacak K., Palkovits M. (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* **22**: 502– 548.

Palha J. A., Fernandes R., Morreale de Escobar G., Episkopou V., Gottesman M. and Saraiva M. J. (2000) Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus but

not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model. *Endocrinology* **141**: 3267–3272.

Palha J. A., Nissanov J., Fernandes R. et al. (2002) Thyroid hormone distribution in the mouse brain: the role of transthyretin. *Neuroscience* **113**: 837–842.

Peeters P.J., Frederik L.P. Fierens F.L.P., van den Wyngaert I., Goehlmann H.W., Swagemakers S.M., Kass S.U., Langlois X., Pullan S., Stenzel-Poore M.P., Steckler T. (2004) Gene expression profiles highlight adaptive brain mechanisms in corticotropin releasing factor overexpressing mice. *Brain Res Mol Brain Res* **129**: 135-50.

Peng X., Wood C.L., Blalock E.M., Chen K.C., Landfield P.W., Stromberg A.J. (2003) Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments. *BMC Bioinformatics* **4**: 26 –34.

Perrin M., Donaldson C., Chen R., Blount A., Berggren T., Bilezikjian L., Sawchenko P., Vale W. (1995) Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2969–2973.

Perry V.H., Hume D.A., Gordon S. (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* **15**: 313-326.

Pisarchik A. and Slominski A.T. (2001) Alternative splicing of CRH-R1 receptors in human and mouse skin: identification of new variants and their differential expression. *FASEB J.* **15**: 2754–2756.

Pitkänen, A., Savander, V. & LeDoux, J. E. (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* **20:** 517–523.

Potter E., Sutton S., Donaldson C., Chen R., Perrin M., Lewis K., Sawchenko P.E., Vale W. (1994) Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8777-8781.

Pozzoli G., Bilezikijan L.M., Perrin M.H., Blount A.L., Vale W.W. (1996) Corticotropin-releasing factor (CRF) and glucocorticoids modulate the expression of type 1 CRF receptor messenger ribonucleic acid in rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology* **137**: 65–71

Raadsheer F.C., van H.J., Lucassen P.J., Hoogendijk W.J., Tilders F.J., Swaab D.F. Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. *Am J Psychiatry* **152**: 1372–1376.

Radulovic J., Ruhmann A., Liepold T., Spiess J. (1999) Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J Neurosci* **19**: 5016–5025.

Radulovic J., Rühmann A., Liepold T., Spiess, J. (1999) Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor and stress: differential roles of corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2. subtypes and emotion. *Biol Psychiatry* **46**: 1480–1508.

Radulovic M., Hippel C., Spiess J. (2003) Corticotropin-releasing factor (CRF) rapidly suppresses apoptosis by acting upstream of the activation of caspases. *J Neurochem* **84**: 1074–1085.

Raffaelli N., Sorci L., Amici A., Emanuelli M., Mazzola F., Magni G. (2002) Identification of a novel human adenylyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 835–840.

Rainnie D.G., Fernhout B.J.H., Shinnick-Gallagher P. (1992) Differential actions of corticotropin releasing factor on basolateral and central amygdaloid neurones, in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **263**: 846–858.

Rajeevan M.S., Vernon S.D., Taysavang N., Unger, E.R. (2001) Validation of arraybased gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagnosis* **3**: 26–31.

Rajkowska G., Miguel-Hidalgo J.J., Wei J., Dilley G., Pittman S.D., Meltzer H.Y. (1999) Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry* **45**: 1085–1098.

Refojo D., Echenique C., Müller M.B., Reul J.M.H.M., Deussing J.M., Wurst W., Sillaber I., Paez-Pereda M., Holsboer F., Arzt E. (2005) Corticotropin-releasing hormone activates ERK1/2MAPK in specific brain areas**.** *Proc Natl Acad Sci U SA* **102**: 6183–6188.

Reul J.M.H.M., Holsboer F. (2002) Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol* **2**: 23–33.

Reyes T.M., Walker J.R., Casey DeCino C., Hogenesch J.B., Sawchenko P.E. (2003) Categorically distinct acute stressors elicit dissimilar transcriptional profiles in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* **23**: 5607–5616.

Roe S. Y., McGowan E. M. and Rothwell N. J. (1998) Evidence for the involvement of corticotrophin releasing hormone in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* **10**: 553-559.

Ross P.C., Kostas C.M., Ramaabhadran T.V. (1994) A variant the human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: cloning, expression and pharmacology. *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 1836–1842.

Rovere C., Viale A., Nahon J.L., Kitabgi P. (1996) Impaired processing of brain proneurotensin and promelanin-concentrating hormone in obese *fat*/*fat* mice. *Endocrinology* **137**: 2954–2958.

Rubin R.T., Poland R.E., Lesser I.M., Winston R.A., Blodgett A.L. (1987) Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. I. Cortisol secretory dynamics in patients and matched controls. *Arch Gen Psychiatry* **44**: 328–336.

Sachar E.J., Baron M. (1979) The biology of affective disorders. *Annu Rev Neurosci* **2**: 505–517.

Saito M., Smiley J., Toth R., Vadasz C. et al. (2002) Microarray Analysis of Gene Expression in Rat Hippocampus After Chronic Ethanol Treatment. *Neurochem Research* **27**: 1221-1229.

Sánchez-Pulido L., Fernando Martín-Belmonte F., Alfonso Valencia A., Alonso M.A. (2002) MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem Sci* **27**: 599-601.

Sandberg R., Yasuda R., Pankratz D.G., Carter T.A., Del Rio J.A., Wodick A.L., Mayford M., Lockhart D.J., Barlow C. (2000) Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11038–11043.

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

Sapolsky R. M. (2001) Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12320–12322.

Sawatari A., Callaway E. M. (2000) Diversity and Cell Type Specificity of Local Excitatory Connections to Neurons in Layer 3B of Monkey Primary Visual Cortex. *Neuron* **25:** 459–471.

Sawchenko P.E., Swanson L.W., Vale W.W (1984) Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1883-7.

Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complentary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470.

Schepert W., Zwart R., Baas F. (2004)Rab6 membrane association is dependent of Presenilin 1 and cellular phosphorylation events. *Brain Res Mol Brain Res* **122**: 17-23.

Scherzer C.R., Offe K., Gearing M., Rees H.D., Fang G., Heilman C.J., Schaller C., Bujo H., Levey A.I., Lah J.J. (2004) Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* **61**: 1200-1205.

Schulz D.W., Mansbach R.S., Sprouse J., Braselton J.P., Collins J., Corman M., Dunaiskis A., Faraci, S., Schmidt A.W., Seeger T., Seymour P., Tingley F.D., Winston E.N., Chen Y.L., Heym J., (1996) CP-154,526: a potent and selective nonpeptide antagonist of corticotropinreleasing factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10477– 10482.

Selye H. (1976) Stress in Health and Disease Butterworth, London.

Serebriski I., Estojak J., Berman M., Golemis E.A. (2000) Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *Biotechniques* **28**: 332–336.

Sheline Y.I., Gado M.H., Price J.L. (1998) Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression. *Neuroreport* **9**: 2023–2028.

Shen F S, Loh Y P. (1997) Intracellular misrouting and abnormal secretion of adrenocorticotropin and growth hormone in Cpe*fat* mice associated with a carboxypeptidase E mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5314–5319.

Sillaber I., Rammes G., Zimmermann S., Mahal B., Zieglgänsberger W., Wurst W., Holsboer F., Spanagel R. (2002) Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors. *Science* **296**: 931–933.

Skutella T., Probst J.C., Renner U., Holsboer F., Behl C. (1998) Corticotropinreleasing hormone receptor (type 1) antisense targeting reduces anxiety. *Neuroscience* **85**: 795-805.

Smith G.W., Aubry J.-M., Dellu F., Contarino A., Bilezikijan L.M., Gold L.H. (1998) Corticotropin releasing factor receptor 1 deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* **20**: 1093–1102.

Smith B.N., Dudek F.E. (1994) Age-related epileptogenic effects of corticotropin-releasing hormone in the isolated CA1 region of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* **72**: 2328–2333.

Smith D.B., Johnson K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.

Smyth D.G., Maruthainar K., Darby N.J., Fricker L.D. (1989) Catalysis of slow C-terminal processing reactions by carboxypeptidase H. *J Neurochem* **53**: 489-493.

Sokolov B.P., Jiang L., Trivedi N.S., Aston C. (2003) Transcription profiling reveals mitochondrial, ubiquitin and signaling systems abnormalities in postmortem brains from subjects with a history of alcohol abuse or dependence. *J Neurosci Res* **72**: 756–767.

Song L., Fricker L., (1995) Processing of procarboxypeptidase E into carboxypeptidase E occurs in secretory vesicles. *J Neurochem* **65**: 444-453.

Sousa J.C, Grandela C., Fernandez-Ruiz J., de Miguel R., de Sousa L, Magalhaes A.I., Saraiva M.J., Sousa N., Palha J.A. J (2004) Transthyretin is involved in depression-like behaviour and exploratory activity. *J Neurochem* **88**: 1052–1058.

Spina M., Merlo-Pich E., Chan R.K.W., Basso A.M., Rivier J., Vale W. (1996) Appetite-suppressing effects of Urocortin, a corticotropin-releasing factor-related neuropeptide. *Science* **273**: 1561–1564.

Stenzel-Poore M.P., Cameron V.A., Vaughan J., Sawchenko P.E., Vale W. (1992) Development of Cushing's syndrome in corticotropin-releasing factor transgenic mice. *Endocrinology* **130**: 3378–86.

Stenzel-Poore M.P., Heinrichs S.C., Rivest S., Koob G.F., Vale W. (1994) Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J Neurosci* **14**: 2579– 2584.

Stout S.C., Owens M.J., Nemeroff C.B. (2002) Regulation of corticotropin-releasing factor neuronal systems and hypothalamic-pituitary adrenalaxis activity by stress and chronic antidepressant treatment. *J Pharmacol Exp Ther* **300**: 1085–1092.

Strijbos P. L. M., Relton J. K. and Rothwell N. (1994) Corticotrophin releasing factor antagonist inhibits neuronal damage induced by focal cerebral ischaemia or activation of NMDA receptors in the rat brain. *Brain Res* **656**: 405-408.

Sullivan G. M., Hatterer J. A., Herbert J. et al. (1999) Low levels of transthyretin in the CSF of depressed patients. *Am J Psychiatry* **156**: 710–715.

Sullivan P.F., Neale M.C., Kendler K.S. (2000) Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* **157**: 1552–1562.

Swanson L.W., Sawchenko P.E., Rivier J., Vale W.W. (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* **36**: 165–186.

Swinny J.D., Metzger F., IJkema-Paassen J., Gounko N.V., Gramsbergen A., van der Want J.J.L. (2004) Corticotropin-releasing factor and urocortin differentially modulate rat Purkinje cell dendritic outgrowth and differentiation *in vitro*. *European Journal of Neuroscience* **19:** 1749-1755.

Takuma K., Matsuda T., Yoshikawa T., Kitanaka J., Gotoh M., Hayata K., Bab A. (1994) Corticotropin-releasing factor stimulates Ca2+ influx in cultured rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 1103-1107.

Teli T., Markovic D., Levine M.A., Edward W. Hillhouse E.W., Grammatopoulos D.K. (2005) Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 1 signaling:

structural determinants for G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and agonist-mediated desensitization**.** *Molecular Endocrinology* **19**: 474–490.

Thibault C., Lai C., Wilke N., Duong B., Olive M.F., Rahman S., Dong H., Hodge C.W., Lockhart D.J., Miles M.F. (2000) Expresssion profiling of neural cells reveals specific patterns of ethanol-responsive gene expression. *Mol Pharmacol* **52 :** 1593–1600.

Theis M., Kausik Si K., Kandel E.R. (2004) Two previously undescribed members of the mouse CPEB family of genes and their inducible expression in the principal cell layers of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9602-9607.

Timpl P., Spanagel R., Sillaber I., Kresse A., Reul J.M.H.M., Stalla G.K.(1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* **19**: 162–166.

Tkachev D., Mimmack M.L., Ryan M.M., Wayland M., Freeman T., Jones P.B. (2003) Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* **362**: 798–805.

Tronche F., Kellendonk C., Kretz O., Gass P., Anlag K., Orban P. C., Bock R., Klein R., Schutz G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* **23**: 99-103.

Tse A., Lee A.K. (2000) Voltage-gated Ca2+ channels and intracellular Ca2+ release regulate exocytosis in identified rat corticotrophs. *J Physiol (Lond)* **528:** 79–90.

Tsien J.Z., Chen D.F., Gerber D., Tom C., Mercer E.H., Anderson D.J., Mayford M., Kandel E.R., Tonegawa S. (1996) Subregion- and cell-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* **87**: 1317-1326.

Udupi V., Gomez P., Song L.X. (1997) Effect of carboxypeptidase E deficiency on progastrin processing and gastrin messenger ribonucleic acid expression in mice with the fat mutation. *Endocrinology* **138**: 1959–1963.

Ulisse S., Fabbri A., Tinajeo J.C, Defau M.L. (1990) A novel mechanism of action of corticotropin releasing factor in rat Leydig cells. *J Biol Chem* **265**: 1964-1971.

Urade Y., Hayaishi O. (1999) Prostaglandin D2 and sleep regulation. *Biochim Biophys Acta* **1436**: 606–615.

Urade Y., Fujimoto N., Kaneko T., Konishi A., Mizuno N., Hayaishi O. (1987) Postnatal changes in the localization of prostaglandin D synthase from neurons to oligodendrocytes in the rat brain. *J Biol Chem* **262**: 15132–15136.

Van Bockstaele E.J., Colago E.E., Valentino R.J. (1998) Amygdaloid corticotropin-releasing factor targets locus coeruleus dendrites: substrate for the co-ordination of emotional and cognitive limbs of the stress response. *J Neurendocrinol* **10**: 743–757.

Van Gelder R.N., Von Zastrow M., Yool A., Dement W.C. Barchas J.D., Eberwine J.H. (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. Proc Nati Acad Sci *USA* **87**: 1663-1667

Van Pett K., Viau V., Bittencourt J.C., Chan R.K.W., Li H.Y., Arias C., Prins G.S., Perrin M., Vale W., Sawchenko P.E. (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* **428**:191-212.

Valdez G.R., Inoue K., Koob G.F., Rivier J., Vale W., Zorrilla E.P. (2002) Human urocortin II: mild locomotor suppressive and delayed anxiolytic-like effects of a novel corticotropin-releasing factor related peptide. *Brain Research* **943**: 142–150.

Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J., (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* **213**: 394–1397.

Vaughan J., Donaldson C., Bittencourt J., Perrin M.H., Lewis K., Sutton S. (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* **378**: 287–292.

Vawter M., Barrett T., Cheadle C., Sokolov B.P., Wood W.H., Donovan D.M, Webster M., Freed W.J, Becker K.G (2001) Application of cDNA microarrays to examine gene expression differences in schizophrenia. *Brain Res Bull* **55**: 641-655.

Volk D.W., Austin M.C., Pierri J.N., Sampson A.R., Lewis D.A. (2000) Decreased glutamic acid decarboxylase 67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical γ-aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **57**: 237–245.

Volkert M.R., Elliott N.A., Housman D.E. (2000) Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 14530–14535.

Walker N. (2002) A technique whose time has come. *Science* **296**: 557–558.

Walther E.U., Dichgans M., Maricich S.M., Romito R.R., Yang F., Dziennis S., Zackson S., Hawkes R., Herrup K. (1998) Genomic sequences of aldolase C (Zebrin II) direct lacZ expression exclusively in non-neuronal cells of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2615–2620.

Wang H.L., Tsai L.Y., Lee E.H.Y. (2000) Corticotropin-releasing factor produces a protein synthesis-dependent long-lasting potentiation in dentate gyrus neurons. *J Neurophysiol* **83**: 343–349.

Weiss S.R., Post R.M., Gold P.W., Chrousos G., Sullivan T.L., Walker D., Pert A. (1986) CRF-induced seizures and behavior: interaction with amygdala kindling. *Brain Res* **372**: 345–351.

White J., Johannes L., Mallard F., Girod A., Grill S., Reinsch S., Keller P., Tzschaschel B., Echard A., Goud B., Stelzer E.H. (1999), Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol* **147**: 743– 760.

Whitney L.W., Becker K.G., Tresser N.J., Caballero-Ramos C.I., Munson P.J., Prabhu V.V., Trent J.M., Farland H.F., Biddison W.E. (1999) Analysis of gene expression in mutiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* **46**: 425–428.

Wight P.A, Dobretsova A. (2004) Where, when and how much: regulation of myelin proteolipid protein gene expression. *Cell Mol Life Sci* **61**: 810-21.

Wilson V.J.C. Graham J.G., McQueen I.N.F., Thompson R.J. (1980) Immunoreactive aldolase C in cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders. *Ann Clin Biochem* **17**: 110–113.

Wong, M.L., Kling, M.A., Munson, P.J., Listwak, S., Licinio, J., Prolo, P., Karp, B., McCutcheon, I.E., Geracioti Jr., T.D., DeBellis, M.D., Rice, K.C., Goldstein, D.S., Veldhuis, J.D., Chrousos, G.P. Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 325-330.

Woo T.U., Whitehead R.E., Melchitzky D.S., Lewis D.A. (1998) A subclass of prefrontal γ-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5341–5346.

Yang Y.H., 1, Dudoit S., Luu P., Lin D.M., Peng V., Ngai J., Speed T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15.

Ye Q., Worman, H. J. (1995) Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Experimental Cell Re.* **219**: 292-298.

Yool D.A., Klugmann M., McLaughlin M., Vouyiouklis D.A., Dimou L., Barrie J.A. (2001) Myelin proteolipid proteins promote the interaction of oligodendrocytes and axons. *J Neurosci. Res* **63:** 151–164.

Yumiko Motoi Y., Aizawa T.,, Seichi Haga S., Nakamura S., Namba Y., Ikeda K. (1999) Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Research* **833**: 209–215.

Zhao X., Lein E. S., He A., Smith S. C., Aston C., Gage F. H. (2001). Transcriptional profiling reveals strict boundaries between hippocampal subregions. *J Comp Neurol* **441**: 187–196.

Zhu Y., Pak D., Qin Y., McCormack S.G., Kim M.J., Baumgart J.P., Velamoor V., Auberson Y.P., Osten P., van Aelst L., Sheng M., Zhu J.J. Rap2-JNK Removes Synaptic AMPA Receptors during Depotentiation. *Neuron* **46**: 905–916.

Zirlinger, M. (2003) Selection and validation of microarray candidate genes from subregions and subnuclei of the brain. *Methods* 31: 290–300.

Zorrilla E.P., Valdez G.R., Nozulak J., Koob G.F., Markou A., (2002) Effects of antalarmin, a corticotropin-releasing factor type 1 receptor antagonist, on anxiety-like behavior and motor activation in the rat. *Brain Res* **952**: 188–199.

Danksagung

Ich möchte mich natürlich bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeit betreut und unterstützt haben.
Besonderer Dank gebührt dabei Dr. Jan Deussing, der durch zahlreiche wertvolle Anregungen und guten Ideen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für die intensive und geduldige Überarbeitung des Manuskripts. Ich möchte mich außerdem bei Prof. Dr. Wolfgang Wurst bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seiner Forschungssgruppe durchzuführen und mich mit hilfreichen Diskussionen und Anregungen unterstützt hat. Dankbar bin ich auch für die Freiräume in der Gestaltung und Durchführung, die mir eingeräumt wurden, die sicherlich mein selbstständiges Denken und Handeln gefördert haben.
Vielen Dank auch an die Mitglieder der *Microarray*-Arbeitsgruppe, Claudia Kühne, Benno Pütz und Markus Panhuysen, die mir dieses Projekt ermöglicht haben. Besonders Claudia möchte ich hier für ihre tatkräftige Unterstützung und ihrer Geduld im Labor danken. Außerdem bedanke ich mich bei Maik Engeholm, der mir die grundlegenden Kenntnisse des *Yeast two-hybrid*-Verfahrens beigebracht hat. Bei Johannes bedanke ich mich für seine Hilfe und Anregungen und dafür, mich zu motivieren. Selbstverständlich gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe für die ihre Hilfe und für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank auch an Konstanze und Nanni für das Korrekturlesen dieser Arbeit. An Nanni richtet sich mein besonderer Dank für ihre Unterstützung auf vielfältige Weise auch außerhalb des Labors. Weitherhin bedanke ich mich bei Klaus Hechenbichler, ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe Statistik am MPI, für die Auswertung der Daten.
Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Gierl und Prof. Dr. Schneitz für ihre Bereitschaft meine Dissertation zu beurteilen und die Promotionsprüfung durchzuführen.
Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich ganz besonders und von ganzen Herzen bedanken, da ich es ohne sie nie soweit geschafft hätte, and thank you, Kris.