

**Die Funktion der Dlk/ZIP-Kinase  
in der  
androgenabhängigen Transkription**

**Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Peter Heinrich Leister  
aus Euskirchen

- 2007 -

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
am Institut für Genetik unter der Leitung von  
Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann

Erstgutachter: Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. Otto Traub

Tag der Promotion: 30. November 2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver  
der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online)  
elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Kinasen und Phosphorylierungen.....	1
1.2. Die wichtigsten Prozesse in der Zelle werden durch Kinasen gesteuert.....	1
1.3. DAP-Kinase Familie.....	3
1.3.1. Die "Death Associated Protein Kinase" (DAPK).....	5
1.3.2. Die Dlk / ZIPK.....	6
1.4. Interaktionspartner der ZIPK.....	8
1.4.1. AATF ein Transkriptionsfaktor und Interaktionspartner der ZIPK.....	11
1.4.2. AATF, ein Koaktivator von Steroidrezeptoren.....	13
1.5. Die Kernrezeptoren.....	14
1.6. Transkriptionsinitiation der Steroidrezeptoren.....	16
1.7. Medizinische Relevanz, Prostatakrebs.....	19
1.8. Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
<b>2. Ergebnisse.....</b>	<b>22</b>
2.1. ZIPK steigert die Androgenrezeptor abhängige Transkription .....	22
2.1.1. Steigerungseffekt der ZIPK ist auch in anderen Zelllinien Messbar.....	25
2.1.2. Auch die p53-abhängige Transkription wird von der ZIPK verstärkt..	27
2.1.3. Kooperation mit AATF.....	28
2.2. Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen ZIPK und dem Androgenrezeptor.....	30
2.2.1. Die Bindungsdynamik der ZIPK an den Androgenrezeptor.....	32
2.2.2. Auch die endogenen Kinase- und Rezeptorproteine interagieren....	33
2.3. Kartierung der Interaktionsdomäne der Kinase.....	34
2.4. Untersuchung der Lokalisation von Androgenrezeptor und ZIPK.....	36
2.4.1. Lokalisation der Proteine im Einzelnen.....	37
2.4.2. Koloalokalisation der ZIPK und dem Androgenrezeptor.....	38
2.5. AATF stabilisiert die Interaktion von ZIPK und Androgenrezeptor.....	41
2.6. AATF und ZIPK sind an androgenabhängigen Promotoren nachweisbar....	43
2.6.1. ZIPK und AATF erscheinen hormonabhängig auch am Enhancer des PSA-Promotors .....	46
2.6.2. AATF und ZIPK bilden einen gemeinsamen Komplex mit dem AR am aktiven PSA-Promotor.....	47

2.7. Die ZIPK spielt eine essentielle Rolle in der Aktivierung androgenabhängiger Promotoren.....	48
2.8. Mögliche Phosphorylierungssubstrate der ZIPK im Rahmen der Transkriptionsinitiation.....	51
<b>3. Diskussion.....</b>	<b>53</b>
3.1. Die ZIPK in der Transkription.....	53
3.2. Identifizierung der ZIPK als Koaktivator des Androgenrezeptors .....	54
3.3. Die ZIPK wird über zwei getrennte Domänen assoziiert.....	56
3.4. AATF und die ZIPK kooperieren in ihrer Koaktivatorfunktion und ihrer Interaktion mit dem Rezeptor.....	58
3.5. Die Expression der ZIPK ist für eine effiziente Transkription essentiell.....	59
3.6. Die ZIPK partizipiert schon an sehr frühen Ereignissen in der Transkriptionsinitiation.....	60
3.7. AR, AATF und ZIPK bilden gemeinsame Komplexe.....	61
3.8. AATF ein multifunktionaler Koaktivator.....	62
3.9. Die Kinaseaktivität der ZIPK spielt eine wichtige Rolle in der Lokalisation von Rezeptor und Kinase.....	64
3.10. Die Funktion der Kinase in der Transkription.....	65
3.11. Die ZIPK im Netzwerk der Transkriptionsregulation.....	67
3.12. Die ZIPK, ein Potentielles Target in der Krebstherapie?.....	70
3.13. Ausblick.....	71
<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>4. Material.....</b>	<b>76</b>
4.1. Chemikalien und Enzyme.....	76
4.2. Stammlösungen und Puffer.....	76
4.3. Medien.....	78
4.4. Bakterienstämme und Zelllinien.....	79
4.5. Plasmide.....	80
4.6. Deletions und Mutagenesekonstrukte.....	81
4.7. Oligonukleotidprimer.....	81
4.8. Antikörper.....	81
<b>5. Methoden.....</b>	<b>83</b>
5.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	83
5.1.1. Restriktionsverdau.....	83

5.1.2. Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	83
5.1.3. Agarosegel-Elektrophorese.....	83
5.1.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	84
5.1.5. Phenol/Chloroformreinigung.....	84
5.1.6. Ligation.....	85
5.1.7. Herstellung kompetenter Bakterien.....	85
5.1.8. Transformation.....	85
5.1.9. Analytische Plasmidregulierung (mini-Präp).....	86
5.1.10. Präperative Plasmitisolierung (Midi-Präp).....	87
5.1.11. Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	87
5.1.12. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	88
5.2. Proteinchemische Techniken.....	90
5.2.1. Immunpräzipitation (IP).....	90
5.2.2. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	91
5.2.3. Expression von GST-Fusionsproteinen.....	92
5.2.4. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	92
5.2.5. <i>In vitro</i> Transkription und Translation.....	93
5.2.6. <i>In vitro</i> Nachweis von Proteinen-Interaktionen.....	93
5.2.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	94
5.2.8. Coomassiefärbung.....	95
5.2.9. Western Blot.....	95
5.2.10. Proteinbestimmung nach Bradford.....	96
5.3. Zellkulturmethoden.....	96
5.3.1. Kultur von Säugerzellen.....	96
5.3.2. Transfektion von Säugerzellen.....	97
5.3.3. Luciferasenachweis.....	98
5.4. Fluoreszenzmikroskopische Analysen.....	100
5.4.1. Immunofluoreszenzfärbung.....	101
5.4.2. DAPI-Färbung.....	101
5.4.3. „Green-Fluorescent“-Protein (GFP).....	101

## **Anhang** **103**

Abkürzungsverzeichnis.....	103
Literaturverzeichnis.....	105
Veröffentlichungen.....	123
Lebenslauf .....	124
Erklärung.....	124

# 1. Einleitung

## 1.1. Kinasen und Phosphorylierungen

Die Phosphorylierung ist im chemischen Sinne die Veresterung eines Phosphats mit Hydroxylgruppen von Aminosäureresten an Proteinen oder Metaboliten. Diese Reaktion wird in der Biologie durch Enzyme katalysiert, die man in die Gruppe der Kinasen einordnet (Hanks *et al*, 1988). Kinasen werden in der Regel anhand ihrer Substrate bezeichnet. Bei den Proteinkinasen unterscheidet man je nach Substratspezifität zwischen Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen.

In der Regel erfolgt die Phosphorylierung unter Spaltung von ATP, dem universellsten Energieträger der Zelle. Durch die kovalente Anheftung des Phosphats erfolgt am Substratprotein eine Änderung der Oberflächenladung, was mit veränderten Oberflächeneigenschaften und Interaktionsspezifitäten einhergeht. Auch die Veränderung der sterischen Struktur des Proteins und eine Veränderung der enzymatischen Aktivität wie beispielsweise der Kinaseaktivität sind möglich (Krebs, 1985).

Nach den Transkriptionsfaktoren sind Kinasen mit gut 500 Genen die zweitgrößte Genfamilie. Knapp 2 % aller bekannten Gene kodieren für Kinasen (Manning *et al*, 2002). Den Kinasen stehen die Phosphatasen gegenüber, eine Enzymklasse, welche die Wiederabspaltung der Phosphate katalysiert. Phosphatasen sind in der Regel weniger spezifisch, und ihre Genfamilie entsprechend deutlich kleiner als die der Kinasen.

Das Gleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen spielt eine wichtige Rolle in der Weiterleitung und Koordination von intrazellulären Signaltransduktionsprozessen (Kemp *et al*, 1991). Die Regulierung der allgemein transienten Charakteristik von Phosphorylierungen, welche durch die allgegenwärtigen Phosphatasen immer wieder entfernt werden, ist auch deshalb für die Zelle von immenser Bedeutung, weil sie sich dadurch schnell auf Veränderungen ihrer Bedürfnisse und der äußeren Signale einstellen kann (Krebs *et al*, 1979).

## 1.2. Die wichtigsten Prozesse in der Zelle werden durch Kinasen gesteuert

Die wichtigste und am strengsten regulierte Funktion üben Kinasen in der Steuerung des Zellzyklus aus: Hier ist die Familie der cyclinabhängigen Kinasen (Cdk) von elementarer Bedeutung. Cdks sind Kinasen, die durch die Expression ihrer regulatorischen Untereinheit,

den Cyclinen, aktiviert und spezifiziert werden und die Zelle geordnet über die Stationen und Kontrollpunkte des Zellzyklus steuern (Lees, 1995; Nigg, 1995). So werden Cdk4 und 6 in der G1-Phase durch die Expression von Cyclin D aktiviert (Kato, 1999). Diese phosphorylieren den Transkriptionsrepressor pRB, wodurch der pRB/E2F-Komplex als Transkriptionsinitiator aktiv wird (La Thangue, 1996; Ohtani, 1999). Dieser Mechanismus wird als Restriktionspunkt bezeichnet, da die Zelle hier entscheidet, ob sie eine Teilung durchführt. In der Folge werden Cyclin E und A exprimiert, welche Cdk2 aktivieren und die mitotischen Prozesse in der späten G1-Phase und den Übergang in die S-Phase zur Genomreplikation steuern. Während dieser Phase wird hauptsächlich Cyclin A exprimiert, das der Cdk2 für die Replikation spezifische Substrate zuweist (Diffely, 2004). Nach Abschluss des Replikationskontrollpunktes wird wiederum Cdk1 durch die Expression von Cyclin B aktiviert (Fotedar *et al*, 1995), welches die Zelle bis in die Metaphase der Mitose begleitet und erst in der Anaphase mit der Aktivierung des APC (Anaphase Promoting Complex) degradiert wird (Nakayama *et al*, 2006).

Noch lange bevor die Zelle am Restriktionspunkt entscheiden kann, ob eine Zellteilung durchführbar ist, muss sie durch mitogene Hormone von außen zum Wachstum stimuliert werden. Auch in der Internalisierung des Signals und der Transduktion bis hin zur genetischen Antwort spielen verschiedenste Kinasen ausschlaggebende Rollen (Weigel *et al*, 2007; Schwartz *et al*, 1999).

Das prominenteste Beispiel für die Weiterleitung und Verschaltung mitogener Signale ist die MAP-Kinasenkaskade (MacCorkle *et al*, 2005): Mitogene Wachstumsfaktoren wie EGF, FGF oder NGF aber auch Insulin und andere Hormone können die Zellmembran nicht durchdringen und binden extrazellulär an transmembrane Rezeptormoleküle, die Rezeptortyrosinkinasen. Es erfolgt eine Konformationsänderung und Dimerisierung der Rezeptoren. Die cytoplasmatischen Tyrosinkinasedomänen können sich dadurch gegenseitig phosphorylieren und aktivieren. Über SH2-Domänen und Adapterproteine wird das Signal mittels eines kurzen G-Proteinmechanismus (SOS/Ras) an die Kinase Raf weitergegeben. Diese ist die erste Kinase der MAP-Kinasenkaskade. Diese phosphoryliert und aktiviert die MEK, die als dualspezifische Kinase mit der Fähigkeit, sowohl Threonin als auch Tyrosinreste zu phosphorylieren, das Signal verstärkt und letztendlich die MAP-Kinase selbst mittels Phosphorylierung aktiviert (Zhang *et al*, 2002). Diese migriert als Effektor kinase in den Kern, wo sie Transkriptionsfaktoren wie den TCF/SRF aktiviert. Damit ist das mitogene Signal umgesetzt in die Aktivierung der „immediat early genes“ (c-Myc, Fos und c-Jun), der ersten Welle von Transkriptionsfaktoren, die das genetische Programm zur Zellteilung in Gang bringen und schon wenige Stunden nach dem hormonellen Stimulus nachweisbar sind (Chang *et al*, 2003). Als zweite Welle erfolgt die Expression der „late response genes“ wie der D-Cykline und E2F-Transkriptionsfaktoren (Coquerert, 2002).

Kaum ein Signalweg der Zelle kommt ohne Kinasen aus. Als weiteres Beispiel sei noch der JAK/STAT-Signalweg erwähnt. Die Rezeptoren von Cytokinen wie IL (Interleukine) oder TNF (Tumor Necrosis Faktoren) rekrutieren nach ihrer Aktivierung eine eigene Tyrosinkinase. Diese Tyrosinkinase, wird als JAK (Janus Kinase) bezeichnet. Ihr Substrat ist zunächst der Rezeptor selbst, an den im phosphorylierten Zustand Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie über ihre SH2-Domänen assoziieren können. Diese werden daraufhin ebenfalls von der JAK phosphoryliert. Die Phosphorylierung erlaubt den STAT-Proteinen zu dimerisieren und als aktives Dimer in den Zellkern importiert zu werden. Dort induzieren sie dann die Aktivierung ihrer Zielgene, wie beispielsweise des NF $\kappa$ B- oder auch des p21-Promotors (Weber-Nordt *et al*, 1998).

Auch in der initialen Aktivierung von Promotoren spielen Phosphorylierungsprozesse eine entscheidende Rolle. Der Bereich der Histonmodifikationen und Chromatinstrukturierung wird unter Abschnitt 1.5. (Transkriptionsinitiation der Steroidrezeptoren) näher behandelt. In der Initiation der RNA-Polymerase und der Elongation der mRNA besitzen spezielle Kinasen wie die Cdk9 mit Cyklin T (Napolitano *et al*, 2002) oder die Cdk7 mit Cyklin H eine wichtige Funktion. Sie phosphorylieren die RNA-Polymerase II an ihrer C-terminalen Domäne und gewährleisten so das Ablösen der Polymerase vom Promotorkomplex, so dass eine effiziente Elongation ermöglicht wird (Fischer, 2005).

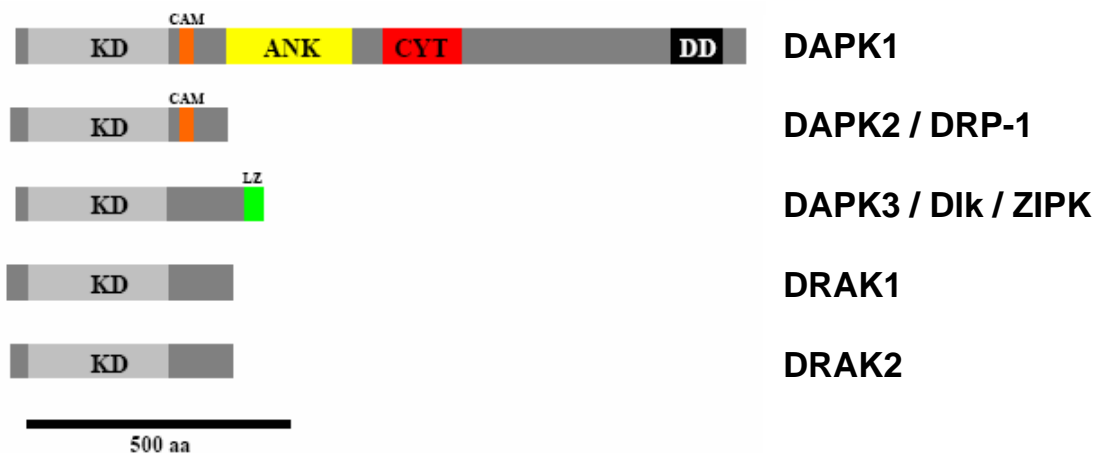
Es ist nicht unüblich, dass man für eine bestimmte Kinase mehrere Funktionen in völlig unterschiedlichen zellulären Prozessen nachweisen konnte (Golsteyn *et al*, 1996; Musashi *et al*, 2000). Beispielsweise konnten für die Akt-Kinase neben ihrer Funktion als antiapoptotische Effektorkinase viele weitere Verknüpfungen gefunden werden. So wurden auch Funktionen im Zellzyklus, der Stoffwechselregulation und verschiedener Transkriptionsprozesse entdeckt (Brazil *et al*, 2001; Liang und Slingerland, 2003). Dies zeigt zum einen von welcher universeller Bedeutung manche Kinasen in der Zelle sind, und zum anderen konnten so schon oft neue Verknüpfungen zwischen Signalwegen und endogenen Prozessen aufgezeigt werden. Folglich ist es auch nicht verwunderlich, dass unter den Kinasen zahlreiche potentielle Onkogene und Tumorsuppressoren zu finden sind.

### **1.3. Die Familie der DAP-Kinasen**

Die DAP-Kinasen sind eine Gruppe von Serin/Threonin spezifischen Kinasen, die aufgrund der Homologie ihrer Kinasedomänen einer Genfamilie zugeordnet werden. Namensgebend ist die Todesdomäne der DAPK (Death Associated Protein Kinase), welche typisch für apoptotische Effektormoleküle ist. Die DAP-Kinase Familie (Abb. 1.1.) besteht aus



5 Mitgliedern (Shohat *et al*, 2002; Kögel *et al*, 2001): Neben der DAPK gehört auch die DRP-1/DAPK2 (DAP Kinase Related Protein 1 oder Death Associated Protein Kinase 2) zu den DAP-Kinasen (Kawai *et al*, 1999). Ein weiteres Mitglied dieser Familie wurde in unserer Arbeitsgruppe identifiziert und aufgrund seiner Homologie als Dlk (DAP like kinase) bezeichnet (Kögel *et al*, 1998; Scheidtmann, 2007). Auch DAPK3 oder ZIPK (Zipper Interacting Proteinkinase) sind als Namen für diese Kinase gebräuchlich. Außerdem sind noch zwei weitere Kinasen, die DRAK1 und DRAK2 (DAP-Kinase Related Apoptosis inducing Protein Kinase 1 und 2) entferntere Verwandte der DAPK (Inabel *et al*, 2000; Kögel *et al*, 2001). Die Sequenzhomologie innerhalb der DAP-Kinasen beschränkt sich fast ausschließlich auf die bei allen N-terminal gelegene Kinasedomäne. Die Kinasedomänen der Dlk/ZIPK und der DRP-1/DAPK2 zeigen dabei mit 83,3 % bzw. 79,8 % eine markante Sequenzhomologie zur DAPK. Im Gegensatz dazu sind die Kinasedomänen der DRAK1 und der DRAK2 nur zu 48,5 % bzw 51,9 % homolog mit der DAPK (Sanjo *et al*, 1998).



**Abb. 1.1.: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der DAP-Kinase Familie** (nach Kögel *et al*, 2001). DAP-Kinase (DAPK), DAP kinase related protein 1/DAP kinase 2 (DRP-1/DAPK2), DAP like kinase (Dlk) oder ZIPK, DAP kinase related apoptosis inducing protein kinase 1 und 2 (DRAK1 und DRAK2). KD (hellgrau) kennzeichnet die hoch konservierte Kinasedomäne aller fünf Kinasen, und CAM (orange) zeigt die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin bindenden Regionen der DAPK1 und DRP-1/DAPK2. ANK (gelb) und CYT (rot) sind die Ankyrin wiederholende Region bzw. die Cytoskelett-bindende Region der DAPK. DD (schwarz) bezeichnet die Todesdomäne der DAPK1. Der C-terminal gelegene Leucinzipper der ZIPK ist mit LZ gekennzeichnet.

Alle DAP-Kinasen werden ubiquitär in zahlreichen Geweben exprimiert und entfalten bei ihrer Überexpression in Säugerzellen proapoptotische Wirkung, wobei die Induktion der Apoptose von der enzymatischen Aktivität der Kinasen abhängig ist (Kögel *et al*, 2001; Shohat *et al*, 2002).

Die C-terminalen Bereiche der Kinasen sind individuell unterschiedlich und verantwortlich für verschiedene Interaktionen und damit auch für die Regulation und Substratspezifität jeder einzelnen Kinase. Ebenso ist die subzelluläre Lokalisation der DAP-Kinase

Familienmitglieder unterschiedlich. Die DAPK assoziiert mit den Aktinfilamenten des Cytoskeletts (Cohen *et al*, 1997), während die Dlk/ZIPK ein Kernprotein mit punktuellen Zentren, sogenannten „Speckles“ ist (Kögel *et al*, 1998). Die DRAK1 und DRAK2 sind ebenfalls kernständige Kinasen, jedoch mit eher diffuser Verteilung (Sanjo *et al*, 1998). Die DRP-1/DAPK2 ist relativ gleichmäßig verteilt im Cytoplasma der Zellen lokalisiert (Kawai *et al*, 1999; Inbal *et al*, 2000).

### 1.3.1. Die “Death Associated Protein Kinase” (DAPK)

Die 160 kD große DAPK besteht aus der N-terminalen Kinasedomäne und einem C-terminalen Multidomänenbereich. Hier liegt eine  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin Binderegion, eine Ankyrin Region (ANK), die 8 Wiederholungen umfasst, und die Assoziation mit dem kortikalen Cytoskelett der Plasmamembran ermöglicht. Zusätzlich liegt hier die Region, welche für die Interaktion mit den Aktin-Filamenten des Cytoskeletts verantwortlich ist (Cohen *et al*, 1997; Bialik *et al*, 2004), sowie die Todesdomäne (Death Domain), welche für proapoptotische Effektorproteine charakteristisch ist (Shohat *et al*, 2002).

Die proapoptotische Funktion der DAPK, welche auf ihrer katalytischen Aktivität und ihrer Todesdomäne (Cohen *et al*, 1999; Raveh *et al*, 2000) beruht, scheint in der apoptotischen Signalkaskade unmittelbar den p19ARF/p53-abhängigen apoptotischen Kontrollpunkt zu aktivieren (Raveh *et al*, 2001). Die Aktivität der DAPK wird von einer Vielzahl von apoptotischen Signalen einschließlich IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Fas, oder durch Abtrennung der Zelle von der extrazellulären Matrix (Anoikis) verstärkt (Deiss *et al*, 1995; Inabel *et al*, 1997; Cohen *et al*, 1997 und 1999; Raveh *et al*, 2001). Die DAPK spielt offenbar eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der extrinsischen, Todesrezeptor-vermittelten Apoptoseinduktion. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion der DAPK von Bcl-2 inhibiert wird (Cohen *et al*, 1999), was eine Verknüpfung mit dem intrinsischen, mitochondrialen Weg der Apoptose suggeriert. Auf Transkriptionsebene kann die Expression der DAPK durch Onkogene wie c-Myc und E2F-1 gesteigert werden (Deiss *et al*, 1995).

Für die Regulation ihrer katalytischen Aktivität konnte gezeigt werden, dass die DAPK mit Hilfe ihrer CAM-Domäne  $\text{Ca}^{2+}$  gebundenes Calmodulin rekrutiert, was zur Aktivierung der Kinase führt. Dadurch wird die aktivierende Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit, MLC („Myosin Light Chain“) an Serin 19 stimuliert (Jin *et al*, 2001), was wiederum eine drastische Strukturänderung des kortikalen Aktinskeletts zur Folge hat. Hierbei wird angenommen, dass die DAPK auf den Wechsel der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reagiert, der während der Apoptose auftritt (Baffy *et al*, 1993; Pinton *et al*, 2000).

Die DAPK ist autokatalytisch aktiv und phosphoryliert Serin 308 innerhalb ihrer CAM-Domäne. Dadurch wird die Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin verringert und somit die Kinaseaktivität reduziert. Damit besitzt die Kinase eine autoinhibitorische Regelungsschleife, wodurch die Zelle im Ruhezustand vor der proapoptotischen Funktion der DAPK geschützt wird (Shohat *et al*, 2001).

Die DAPK könnte als Tumorsupressor klassifiziert werden, weil in vielen Tumorzelllinien ihre Expression mittels DNA-Hypermethylierung im Promotorbereich unterdrückt ist (Kissil *et al*, 1997; Yamamoto *et al*, 1999; Cohen *et al*, 2001).

### 1.3.2. Die Dlk/ZIP-Kinase

Die „DAP like kinase“ zeigt in ihrer N-terminalen Kinasedomäne die nächste Verwandtschaft zur DAPK (Kögel *et al*, 2001). Das humane Ortholog der Dlk wurde als Interaktionspartner von ATF-4 gefunden und aufgrund des charakteristischen Leucinzipfers als ZIPK (Zipper Interacting Proteinkinase) bezeichnet (Kawai *et al*, 1998). Da die Benennung ZIPK mittlerweile in der Literatur zum allgemein gebräuchlichen Namen avancierte, soll diese Bezeichnung auch in dieser Arbeit Verwendung finden.

Die C-terminale Region der ZIPK zeigt keine Homologie zu bekannten Proteinen. Hier liegt der Leucinzipper, welcher die Interaktion mit AATF und anderen Interaktionspartnern vermittelt, sowie das funktionelle Kernlokalisierungssignal. Im Gegensatz zur DAPK löst die ZIPK alleine keine Apoptose aus. In Koexpression mit ihrem Interaktionspartner Par-4 (prostate apoptosis response) jedoch vermag die ZIPK Apoptoserate drastisch zu steigern (Page *et al*, 1999; Vetterkind *et al*, 2005). Das Gen ist bei allen Säugern hoch konserviert und mit 99,8 % (murin) bzw. 92,9 % (human) stark homolog zum Ortholog der Ratte (Kögel *et al*, 2001).

Die ZIPK ist autokatalytisch aktiv und phosphoryliert *in vitro* die leichte Kette von Myosin (MLC), sowie die Histone 2A, 3 und 4 (Kögel *et al*, 1998). Außerdem gehören EZRIN (Imam Chasan, Diplomarbeit 2007), STAT3 (Sato *et al*, 2005), Par-4 (Boosen, Doktorarbeit 2007) und möglicherweise p21 (Bruch *et al*, 2004) zu den spezifischen Substraten der ZIPK. Zusätzlich werden SC35 aus der SR-Spleißfaktorfamilie und der eng verwandte Spleißfaktor ASF/SF2 (Engemann *et al*, 2002; Engemann Dissertation, 2006) sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (Preuß *et al*, 2003 a) von der ZIPK *in vitro* phosphoryliert.

Lokalisiert ist die ZIPK normalerweise in diskreten Punkten („Speckles“) im Zellkern. Diese sind teilweise mit den „PML-Bodies“ kolokalisiert (Kögel *et al*, 1999). Es handelt sich dabei um dynamische nukleare Mikrodomänen, welche möglicherweise Bereiche aktiver Transkription darstellen (Eskiw *et al*, 2002), aber auch Zentren der Apoptoseinduktion im

Kern verkörpern (Bernadi *et al*, 2003). Diese Multiproteinkomplexe enthalten unter anderem Tumorsuppressoren und Transkriptionsfaktoren (z.B. p53, pRB, p27, Bax, Daxx, CBP, HMG1/2, SUMO 1). Der für die Bildung dieser Komplexe erforderliche Transkriptionsfaktor PML (promyelocytic leukemia protein) ist ebenfalls als Tumorsuppressor beschrieben worden (Ishov *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998).

Aufgrund der Tatsache, dass die ZIPK mit Transkriptionsfaktoren wie AATF und ATF4, sowie CDC5 und STAT3 interagiert, sowie ihrer Fähigkeit, verschiedene Histone zu phosphorylieren, liegt bereits eine Beteiligung der ZIPK an Transkriptionsereignissen und möglicherweise auch an der Chromatinstrukturierung nahe.

Befunde unserer Arbeitsgruppe deuten jedoch auch auf eine Rolle der ZIPK in der Mitosesteuerung hin. Während der Mitose kolokalisiert sie mit den Centrosomen, sowie mit den Metaphasencentromeren. In der Cytokinese lässt sie sich neben der Zentralspindel auch am kontraktilen Ring nachweisen (Preuss *et al*, 2003 a). Diese auffällige Anordnung während der Mitose ähnelt der von „Chromosomal Passengers“, Proteinkomplexe die wichtige Funktionen in der Mechanik der Chromosomensegregation und der Cytokinese ausüben (Vagnarelli *et al*, 2004; Yanagida, 2005). Interessanterweise erfolgt gleichzeitig mit der Assoziierung der ZIPK mit den Centromeren eine spezifische Phosphorylierung von Histon H3 am Threonin 11 (Preuss *et al*, 2003 b).

Die Regulation der ZIPK erfolgt hauptsächlich über Phosphorylierungen. Es wurde gezeigt, dass sich durch Autophosphorylierung der Reste T180, T225 und T265 die Kinaseaktivität steigert (Graves *et al*, 2005). Zudem kann die ZIPK von der DAPK phosphoryliert werden (Shani *et al*, 2004), was eine Hierarchie in der Verknüpfung der beiden Kinasen im Rahmen der Apoptoseinduktion andeutet.

Weitere Befunde zeigten eine Phosphorylierung der ZIPK durch die Rho-Kinase, die für die Organisation und Aktivität des Aktin-Myosin-Systems essentiell ist (Hagerty *et al*, 2006). Dieser Regulationsmechanismus schließt die ZIPK in die durch die Rho-GTPase aktivierten Signalwege mit ein. Für glatte Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass die ZIPK als MLC-Kinase an der Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen Kontraktion mitwirkt, hierbei wird sie durch ROCK phosphoryliert und aktiviert (Ihara *et al*, 2007; Hagerty *et al*, 2007).

Neben der Aktivierung der Kinasefunktion wird auch die subzelluläre Lokalisation der ZIPK durch Phosphorylierung bestimmt (Graves *et al*, 2005; Shani *et al*, 2004). Hier scheint vor allem die Phosphorylierung des Threonin 299 ausschlaggebend zu sein. Von Graves und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Threonin 299 der ZIPK zu einer Relokalisation des Proteins aus dem Zellkern ins Cytoplasma führt. Hier kann sie in Verbindung mit Par-4 proapoptische Wirkung entfalten.

## 1.4. Interaktionspartner der ZIPK

Um die Funktionen eines neuen Proteins im regulatorischen Netzwerk der Zelle näher zu charakterisieren sind die Interaktionspartner ausschlaggebend. Die bisher bekannten Interaktionspartner der ZIPK lassen sich grob in drei Gruppen einteilen: Zum Ersten gibt es eine Gruppe von Interaktionspartnern, die eine Funktion in der Organisation des Cytoskeletts haben, und die damit auch im Rahmen der Cytokinese eine Funktion im Bereich des kontraktilen Rings ausüben. Die Zweite und bislang größte Gruppe von Interaktionspartnern umfasst verschiedene Transkriptionsfaktoren und transkriptionsrelevante Proteine, während die dritte Gruppe von Interaktionspartnern die Bedeutung der ZIPK in der Apoptoseinduktion aufzeigt.

### 1. Cytoskelettassoziierte und mitoserelevante Proteine:

Eine wichtige Funktion der ZIPK stellt offenbar die Regulation des Kontraktionsapparates dar. So ist ZIPK in der Lage die regulatorische Myosin-Leichte-Kette (MLC) an Threonin 18 und Serin 19 zu phosphorylieren (Murata-Hori *et al*, 1999; Kögel *et al*, 1998; Komatsu und Ikebe 2004). Bemerkenswert ist aber die Tatsache, dass die ZIPK nicht nur durch Phosphorylierung von MLC den Myosin-II-Komplex aktiviert, sondern zusätzlich die Dephosphorylierung von MLC verhindert, indem sie MYPT-1 phosphoryliert, welches die „Targeting-Untereinheit“ der Myosin-Phosphatase ist (MacDonald *et al*, 2001b).

Hinzu kommt die Phosphorylierung von CPI-17, einem Protein, welches im phosphorylierten Zustand zusätzlich die Myosin-Phosphatase inhibiert (MacDonald *et al*, 2001a). Diese Regulation ist für die Zellmotilität, sowie für die Kontraktion der glatten Muskulatur und in der Cytokinese wichtig. Im Hinblick auf die Einleitung der Cytokinese ist vor allem die Phosphorylierung von MLC an Serin 19 ausschlaggebend (Amano *et al*, 1996).

Hier könnte aber auch EZRIN, ein weiterer neuer Interaktionspartner und Substrat der ZIPK eine Rolle spielen (Imam Chasan, Diplomarbeit 2007). Dieses wird von der ZIPK phosphoryliert und kolokalisiert mit ihr am kontraktilen Ring. In seiner aktiven Konformation (von der „ROCK“-Kinase phosphoryliert) vermittelt EZRIN zwischen integralen Plasmamembranproteinen und den Aktinfilamenten des Cytoskeletts. Dies erfolgt auch in Bereichen hoher Membranplastizität wie den Filopodien migrierender Zellen.

Mit welchen Interaktionspartnern die Kinase während früherer Stadien der Mitose an den Centrosomen und Centromeren assoziiert vorliegt, ist noch weitgehend offen.

Nach Burch *et al* (2004) kommt auch eine direkte Phosphorylierung und Interaktion mit dem Cdk-Inhibitor p21, sowie der E3-Ligase MDM2 in Betracht. Damit könnte die ZIPK auch im Rahmen der p53-vermittelten Kontrolle des Restriktionspunkts einen Einfluss auf die Zellteilung haben.

## 2. Transkriptionsfaktoren und transkriptionsrelevante Proteine:

AATF ist ein sekundärer Transkriptionsfaktor, der als Koaktivator des Androgenrezeptors sowie des pRB/E2F-Komplexes und von SP1 beschrieben ist. Aufgrund seiner Relevanz für diese Arbeit, wird AATF ausführlich im folgenden Abschnitt (1.3.1.) abgehandelt.

ATF4 ist ein bislang nur wenig untersuchtes Gen, es ist Mitglied der ATF/CREB Transkriptionsfaktorfamilie und spielt eine Rolle in der ER-Stressantwort (Hamamura *et al*, 2007). Die humane ZIPK wurde als Interaktionspartner von ATF4 identifiziert (Kawai *et al*, 1998).

Ein weiterer Interaktionspartner der ZIPK ist CDC5. Es ist benannt nach seinem Ortholog in *S. pombe*, welches am G2/M-Übergang beteiligt ist (Nasmyth und Nurse, 1981), was auch für Säugerzellen zutreffen könnte (Bernstein und Coughlin, 1997 und 1998). Das hoch konservierte Phosphoprotein von 802 Aminosäuren, welches Wachstumsfaktor abhängig in den Kern transportiert wird (Ohi *et al*, 1998), kolokalisiert mit der ZIPK in „Speckles“ und „PML-Bodies“ (Engemann *et al*, 2002). Es kann selbstständig mittels „helix-turn-helix“-Domäne an DNA binden, und offenbarte im Hefeexperiment als Fusionsprotein mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne seine transkriptionelle Aktivität (Bernstein und Coughlin, 1998). Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Expression von CDC5 das alternative Spleißen von pre-mRNAs der Caspase 2 beeinflusst (Tasi *et al*, 1999; Burns *et al*, 1999; McDonald *et al*, 1999). In diesem Zusammenhang konnten unter den Faktoren des Spleißosoms noch weitere Substrate der ZIPK gefunden werden: ASF/SF2 und SC35 (Engemann, Doktorarbeit 2007; Engemann *et al*, 2002).

Ein direkter Einfluss auf die Transkription konnte für die ZIPK bisher nur in Verbindung mit STAT3 gezeigt werden (Sato *et al*, 2005). STAT3 wird durch Cytokine wie Interleukin-6 aktiviert und übt als Transkriptionsfaktor eine wichtige Funktion im Rahmen der Wachstumskontrolle und der Apoptoseinduktion aus. Sein onkogener Charakter zeigt sich in verschiedenen Tumorzellen, in denen es konstitutiv aktiv ist. Es wird angenommen, dass die Interaktion von STAT3 mit der ZIPK und die damit einhergehende Phosphorylierung von STAT3 an Serin 727 dessen transkriptionelle Aktivität verstärkt.

Für STAT3 ist auch eine Interaktion mit dem aktiven Androgenrezeptor beschrieben (Yamamoto *et al*, 2003; De Miguel *et al*, 2003) und es konnte gezeigt werden, dass der Androgen- und der Interleukin-Signalweg am p21-Promotor konvergieren.

## 3. Apoptotische Proteine:

Ein sehr interessanter Interaktionspartner der ZIPK ist Par-4 (prostate apoptosis response 4). Die Expression von Par-4 wird durch apoptotische Stimuli induziert und sensibilisiert Zellen für extrinsische und intrinsische apoptotische Signale (Sells *et al*, 1997). Mit seinem C-Terminus bindet es PKC $\zeta$  und WT1, und verstärkt die Apoptoseneigung der Zellen, indem

es Überlebenssignale blockiert. So bewirkt es, dass WT1 am Bcl-2-Promotor als Repressor wirksam wird, wodurch der Bcl-2-Spiegel sinkt (Johnstone *et al.*, 1996).

Die Koexpression von Par-4 und ZIPK führt dazu, dass letztere ins Cytoplasma gezogen wird, wo beide Proteine mit Aktinfilamenten assoziieren. Dies führt zu einer dramatischen Umstrukturierung des Aktinskeletts und zur Induktion der Apoptose in über 50 % der transfizierten Zellen (Page *et al.*, 1999). Par-4 wird dabei an Threonin 155 von ZIPK phosphoryliert, was für die Induktion der Apoptose unerlässlich ist (Boosen, Doktorarbeit 2007). Der Transkriptionsfaktor AATF wirkt dieser Form der Apoptoseinduktion entgegen (Page *et al.*, 1999) und vermag die Apoptoserate drastisch zu senken. Der hierbei ablaufende Mechanismus ist noch nicht bekannt, könnte aber auf dem Zurückhalten der Kinase im Kern oder auf der in dieser Arbeit beschriebenen Koaktivatorfunktion von ZIPK und AATF auf den Androgenrezeptor beruhen.

Interessanterweise stellt Par-4 ebenfalls eine Verknüpfung zur Androgenrezeptor-vermittelten Transkription dar, denn die Expression von Par-4 verstärkt die androgenabhängige Expression des Onkogens c-Flip (Gao *et al.*, 2006), und es somit auch ein Koaktivator des Androgenrezeptors sein könnte. Im Gegenzug konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Androgenrezeptors der von Par-4 induzierten Apoptose entgegenwirkt (Srinivasan *et al.*, 2007).

Daxx, ein proapoptotisches Protein, kolokalisiert auch mit der ZIPK in den „PML-Bodies“ (Kawai *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass hierbei auf eine neue Art die Apoptose von den PML-Bodies aus im Kern induziert wird. Dort rekrutiert die Kinase neben Daxx offenbar auch Par-4, welches hier phosphoryliert wird. In der Folge konnte eine erhöhte Apoptoserate anhand von Caspaseaktivierung nachgewiesen werden.

Daxx kommt aber auch eine Rolle als Korepressor des Glukokortikoidrezeptors (Obradovic *et al.*, 2004) und des Androgenrezeptors (Lin *et al.*, 2004; Mizuta und Kurode, 2004) zu, was wiederum eine Verbindung zwischen der ZIPK und den Steroidrezeptoren andeutet.

Es bleibt festzuhalten, dass viele beschriebene Interaktionspartner der ZIPK eine Funktion im Rahmen der Transkription ausüben. Speziell die androgenabhängige Transkription erscheint eng mit verschiedenen Interaktionspartnern verknüpft zu sein. Abgesehen vom Zusammenhang der ZIPK mit der STAT3 wurden bis heute keine weiteren Daten über die Relevanz der ZIPK in der Transkription veröffentlicht.

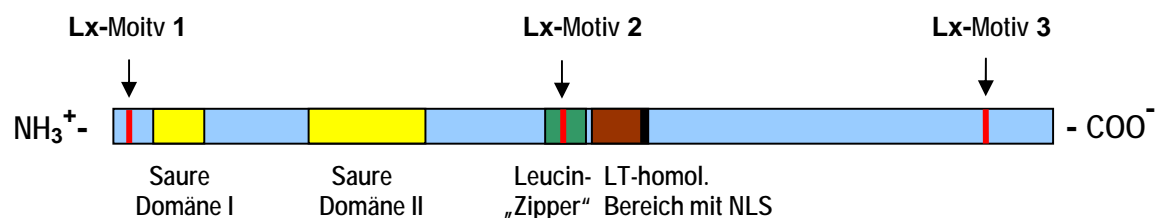
### 1.4.1. AATF ein Transkriptionsfaktor und Interaktionspartner der DIK/ZIPK

AATF wurde zuerst als Interaktionspartner der ZIPK aus einer Rattenfibroblasten-cDNA-Bank (SV52) isoliert (Page *et al*, 1999). Das Protein der ubiquitär exprimierten mRNA umfasst 523 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz und Domänenstruktur ist hoch konserviert: Orthologe Proteine wurden in Maus (Traube, 95 % homolog) und Mensch (Che-1, 75 %) beschrieben (Thomas *et al*, 2000; Fanciulli *et al*, 2000), und auch im Genom von Hefen und Drosophila konnten Proteine gefunden werden, die mit einer Homologie von 37 % bzw. 32 % mit AATF verwandt sind.

N-terminal liegen zwei extrem saure Regionen, welche charakteristisch für Transkriptionsfaktoren wie BRCA1 (Moteiro *et al*, 1996) und VP16 (Triezenberg *et al*, 1988) sind. Tatsächlich entfaltete ein Gal4-AATF-Fusionsprotein in Hefezellen eindeutige Transaktivierungsaktivität, die durch Deletion der sauren Domänen unterbunden wird (Page *et al*, 1999). Da das Protein der Par-4/ZIPK-vermittelten Apoptose entgegen wirkt, wurde es „Apoptosis Antagonizing Transcription Factor“ kurz AATF genannt. Da AATF keine direkte DNA-Bindedomäne besitzt, muss angenommen werden, dass es generell seine Funktion als Kofaktor anderer Transkriptionsfaktoren an aktiven Promotoren ausübt.

Die beiden sauren Domänen (Abb. 1.2.) werden durch einen Serin/Threoninreichen Abschnitt unterbrochen, der zahlreiche potentielle Phosphorylierungstellen mit Konsensussequenzen für die Proteinkinasen CKII, PKA und PKC enthält. Tatsächlich ist AATF an multiplen Stellen phosphoryliert, allerdings konnte *in vitro* keine Phosphorylierung durch die ZIPK nachgewiesen werden.

In der Mitte trägt AATF einen Leucinzipper, der als Interaktionsdomäne für die ZIPK sowie der Untereinheit 11 der RNA-Polymerase II kartiert wurde (Page *et al*, 1999; Fanciulli *et al*, 2000). Dahinter liegt eine 34 Aminosäuren lange Sequenz, die homolog zum onkogenen „Large-T-Protein“ des Affenvirus SV40 ist.



**Abb. 1.2.: Schematische Darstellung des AATF-Proteins.** Das Polypeptid ist 523 Aminosäuren lang. Die schematische Größe der jeweiligen Domäne ist proportional zur Länge in Aminosäuren. Gelb sind die beiden N-terminalen sauren Domänen eingezeichnet. Die Lage des Leucinzippers (grün), des LT-homologen Bereichs (braun), sowie die NLS (schwarz) sind ebenfalls dargestellt. In rot wurde die Lage der LxxLL-Motive markiert.



Am humanen Ortholog Che-1, wurde gezeigt, dass es mit dieser Region an das Tumorsuppressorprotein pRb bindet und somit als Zellzyklusinitiator fungieren kann (Bruno *et al*, 2002). Das postulierte Modell sieht vor, dass pRb über den Transkriptionsfaktor E2F an entsprechende Promotorregionen bindet. pRb inhibiert dabei die Transkription der E2F-abhängigen Gene durch Assoziation mit der Histondeacetylase HDAC1. Durch Interaktion mit Che1/AATF wird der Repressor HDAC1 verdrängt und durch Histonacetyltransferasen ersetzt, wodurch die Repressoraktivität des Gesamtkomplexes aufgehoben wird. Als Folge kann die RNA-Polymerase II unter Mithilfe von AATF assoziiert werden, und es kommt zur Transkription der E2F-abhängigen Gene. Da damit der Restriktionspunkt überwunden werden kann, hätte AATF eine stimulierende Wirkung auf den Zellzyklus. Für eine Rolle von AATF in der Zellzykluskontrolle spricht ebenfalls der Befund, dass AATF bei der TGF $\beta$ -induzierten Differenzierung von Fibroblasten herunterreguliert wird (Lindfors *et al*, 2000), denn die fortschreitende Differenzierung einer Zelle ist immer mit der Inhibition der Proliferation verbunden.

Zum anderen wurde aktuell berichtet, dass AATF auch einen essentiellen Part in der p53-vermittelten „DNA damage response“ ausübt. Die durch DNA-Doppelstrangbrüche oder UV-bedingte Schäden aktivierten ATM- und ATR-Kinasen binden und phosphorylieren AATF. In diesem Kontext wird AATF dann zum Koaktivator in der Transkription von p53. Hierbei könnte AATF als Kofaktor von NF $\kappa$ B funktionieren, und würde so die Rolle eines Tumorsuppressors übernehmen (Bruno *et al*, 2006). Dass ein einzelnes Protein sowohl wachstumsfördernde als auch Tumorsuppressor-Funktionen ausübt, erscheint zunächst widersprüchlich. Wahrscheinlich liegt die Erklärung für diesen Widerspruch in den unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen von AATF, die es je nach Situation verschiedenen Transkriptionskomplexen zuweisen, in denen es dann auf ähnliche Weise als Koaktivator dient (Halazonetis *et al*, 2006; DeNicola *et al*, 2007; Foridi und Fanciulli, 2007).

Hinter dem LT-homologen Bereich liegt das Kernlokalisierungssignal (NLS). Die Expression als GFP-Fusionsprotein ergab, dass es sich um ein Kernprotein handelt. Es lag in einem Teil der Zellkerne diffus, und sonst ähnlich der ZIPK in sogenannten „Speckles“ vor. Bei Koexpression mit ZIPK wurde eine deutliche Kolo-kalisation der „Speckles“ beider Proteine beobachtet.

Interessanterweise wurde das murine AATF im Rahmen eines unspezifischen „knock-outs“ identifiziert (Thomas *et al*, 2000). Die Deletion erwies sich als embryonal letal und zwar in der Präimplantationsphase, Tag E 3,5. Schon im Morulastadium (Tag E 2,5) stoppt die Entwicklung und der Embryo stirbt wenig später ab. Die Untersuchung zeigte, dass die Zellen der Zygote offenbar nicht in der Lage sind, die erste Differenzierungsphase auszuführen. Eine um 50 % reduzierte Zellzahl und eine deutliche Verarmung an Ribosomen gehörten ebenfalls zum Phänotyp. Thomas *et al* spekulieren, dass in der Zygote durch den

Defekt von AATF keine Chromatinaktivierung erfolgt, und somit nicht die erforderliche Kontrolle über die eigene Transkriptionssteuerung erreicht wird.

#### **1.4.2. AATF, ein Koaktivator von Steroidrezeptoren**

AATF besitzt neben den bereits beschriebenen Domänen auch drei Interaktionsmotive der Form LxxLL, die Lx-Motive genannt werden. Da dies typische Strukturmerkmale von Koaktivatoren der Steroidrezeptoren sind, lag diesbezüglich eine Untersuchung nahe. Die drei Motive sind über das gesamte Protein verteilt (Abb. 1.2., rot). Das erste liegt eng am N-Terminus (11-15), das zweite ist mittig im Leuc zipper eingebettet (246-250), und das dritte liegt C-terminal (483-487). Die Lx-Motive bilden eine kurze amphipathische  $\alpha$ -Helix, die in eine hydrophobe Furche von aktivierten Nuklearrezeptoren greift. Röntgenstruktur-Analysen haben gezeigt, dass diese hydrophobe Spalte von drei  $\alpha$ -Helices der Ligandenbindungsdomäne gebildet wird (Bledose *et al*, 2002).

In meiner Diplomarbeit konnte ich *in vitro* eine Interaktion von AATF und dem Androgenrezeptor, dem Estrogenrezeptor sowie dem Glukokortikoidrezeptor nachweisen. Zusammen mit dem Befund, dass die ektopische Expression von AATF die Rezeptorabhängige Transkription steigert, klassifiziert dies AATF als Koaktivator von Steroidrezeptoren (Leister *et al*, 2003). Hierbei spielt vor allem das C-terminale Lx-Motiv eine tragende Rolle.

Außerdem interagiert AATF mit TSG101, einem Tumorsupressor, der seinerseits wiederum an den Androgenrezeptor bindet (Sun *et al.*, 1999; Burgdorf *et al*, 2004). Darauf aufbauend konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass TSG101 an der Regulation der Ubiquitinierung des Rezeptors beteiligt ist (Burgdorf *et al*, 2004). TSG101 besitzt eine E2-Ub-Konjugase-Domäne, die jedoch mutiert ist und kein aktiviertes Ubiquitin binden und übertragen kann. TSG101 kommt möglicherweise die Funktion eines Lizenzfaktors zu, welcher die Richtung von Endocytose und Transport endosomaler Vesikel, sowie der Sortierung von Proteinen in der Zelle vorgibt (Koonin *et al*, 1997).

In der Literatur gibt es diverse Arbeiten, die TSG101 als wichtigen Bestandteil exo- und endocytotischer Prozesse beschreiben (Amit *et al*, 2004; Dupre *et al*, 2001; Carter, 2002). Es interagiert hierbei mit GGA-Proteinen, Adapterproteinen von Clathrin im Vesikeltransport (Mattera *et al*, 2004; Puertollano und Bonifacino, 2004; Hirst *et al*, 2007). Es wird davon ausgegangen, dass TSG101 das erste angeheftete Ubiquitin am Zielprotein gegen weitere Polyubiquitinierung abschirmt (Pronillos *et al*, 2002; Sundquist *et al*, 2004). Damit stabilisiert es das Protein, indem es vor dem Zugriff des proteasomalen Abbaus geschützt wird.

Von Sven Burgdorf wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von TSG101 die monoubiquitinierte Isoform des Androgenrezeptors stabilisiert wird und sich dadurch die Aktivität von androgenabhängigen Promotoren erhöht (Burgdorf *et al*, 2004).

In den Zusammenhang des Vesikeltransportes passt auch der AATF-Interaktionspartner BLOS2/CEAP (Felten *et al*, 2007). Hierbei handelt es sich um einen Verwandten des Hefeproteins She3p, welches in diesem Organismus als mRNA-Transportadapter beschrieben ist (Estrada *et al*, 2003; Gonsalvez *et al*, 2004). In Säugerzellen wurde das Gen als Untereinheit 2 des Biogenesekomplexes von Lysosomen identifiziert (Starcevic und Dell'Angelica, 2004). Mit welchem Mechanismus es die androgen- und p53-abhängige Transkription fördert (Felten *et al*, 2007) ist noch offen.

Zusätzlich konnten auch Hinweise auf eine Interaktion zwischen AATF und Par-4 gefunden werden (Xie und Guo, 2004). Hiermit wurde die antiapoptotische Funktion von AATF untermauert. Welche Relevanz diese Interaktion von AATF und Par-4 für die Steuerung der androgenabhängigen Transkription haben könnte, ist bislang offen.

Ein weiterer Interaktionspartner von AATF, das Adapterprotein Bridge-1 (Sarah Appel, Diplomarbeit 2004) ist auch als Interaktionspartner von CBP/p300 beschrieben, einem klassischen Koaktivator von vielen Transkriptionsfaktoren wie unter anderem den Steroidrezeptoren und p53.

## 1.5. Die Kernrezeptoren

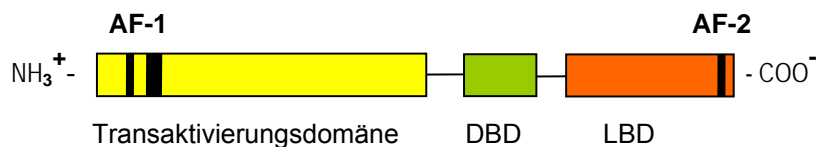
Die Familie der intrazellulären Hormonrezeptoren umfasst bei Säugern ca. 70 verschiedene Rezeptoren. Diese untergliedern sich in drei Klassen:

Klasse I: Steroidrezeptoren: Androgenrezeptor (AR)  
Estrogenrezeptor (ER)  
Glukokortikoidrezeptor (GR)  
Mineralokortikoidrezeptor (MR)  
Progesteronrezeptor (PR)

Klasse II: Nicht-Steroidrezeptoren: Thyroidrezeptor (TR)  
Retinsäurerezeptor (RAR)  
Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor (VR)

Klasse III: Orphanrezeptoren: Rezeptoren für bis heute unbekannte Liganden.  
Diese ist die bislang größte Gruppe.

Alle Mitglieder dieser Familie zeigen die gleiche Domänenstruktur (Abb 1.3.). N-terminal liegt die autonome, ligandenunabhängige Transaktivierungsdomäne, die bei jedem Rezeptor eine eigene spezifische Struktur und Größe besitzt. Sie variiert zwischen 50 und 600 Aminosäuren Länge. Der Kernbereich dieser Domäne, welcher für die transaktivierenden Eigenschaften eines Rezeptors essentiell ist, wird als AF-1 (Activating Function) bezeichnet. Die mittig gelegene DNA-Bindedomäne (DBD) und die C-terminale Liganden-Bindedomäne (LBD) sind bei allen Rezeptoren der Familie weitgehend homolog. Die DNA-Bindedomäne besteht aus einem doppelten Zinkfingermotiv mit jeweils vier Cysteinresten. Die geringfügigen Variationen in dieser Domäne ermöglichen die spezifische Interaktion mit den jeweiligen Konsensussequenzen (Response Elemente) in den Promotoren ihrer Zielgene. Zusätzlich ist diese Domäne auch zuständig für die Dimerisierung der Rezeptoren (Schwabe *et al*, 1991) und enthält eine zweite, ligandenabhängige Transaktivierungsdomäne (AF-2).



**Abb. 1.3.: Schematische Darstellung des Androgenrezeptors als Beispiel für Steroidrezeptoren.**

Der humane Rezeptor ist 918 AS lang und besitzt ein relatives Gewicht von 100 kDa. Das Protein weist folgende Domänen auf: Transaktivierungsdomäne (gelb), DBD = DNA-Bindedomäne (grün), LBD = Liganden-Bindedomäne (rot). Die Bereiche der Transaktivierung wurden noch feiner eingegrenzt auf zwei kurze N-terminale und ein C-terminales Fragment AF-1,2 („Activating Function“, schwarz).

Innerhalb der Steroidrezeptoren sind die DNA-Bindedomänen zu 76–94 % homolog. Die Liganden-Bindedomänen sind zu 40-60 % homolog und unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Ligandenspezifität. Röntgenstrukturanalysen offenbarten eine globuläre Struktur aus über 80 %  $\alpha$ -Helices (Wurtz *et al*, 1996). Hier befindet sich zum einen eine hydrophobe Tasche zur Bindung des entsprechenden Hormons. Zum anderen liegt hier auch das Interaktionsmotiv zur Bindung an Hsp 90, sowie die NLS. Außerdem befindet sich in der Liganden-Bindedomäne die hydrophobe Furche, welche die Assoziation von Kofaktoren mittels Lx-Motivs ermöglicht (Folkertsma *et al*, 2005).

Ohne Hormon befinden sich die Steroidrezeptoren (Klasse I) im Cytoplasma, wo sie durch Hsp 90 und Hsp 70 in der inaktiven Konformation stabilisiert werden. Hsp 90 deckt dabei auch die NLS ab und verhindert so den Kernimport (Shank und Pascal, 2005). Dagegen verbleiben viele „Nicht-Steroidrezeptoren“ (Klasse II) in Abwesenheit des Hormons als Heterodimer an die Promotorregionen ihrer Zielgene gebunden und wirken durch die Bindung von Korepressoren wie der Histondeacetylase SMRT oder RIP 140 als aktiver

Repressor der Gene in diesem Bereich. Korepressoren besitzen geringfügig größere Lx-Motive als die Aktivatoren und binden bevorzugt an nicht ligandengebundene Rezeptoren der Klasse II. Koaktivatoren können nur an ligandengebundene, aktive Rezeptoren stabil binden.

Da die Liganden wie beispielsweise die Cholesterolderivate der Steroidrezeptoren allgemein lipophil sind, können sie die Plasmamembran problemlos passieren. Wird das Steroidhormon dann innerhalb der Zelle vom Rezeptor gebunden, durchläuft dieser eine Konformationsänderung (Roy *et al*, 2001). Hsp 90 dissoziiert ab, die NLS wird zugänglich und der Rezeptor wird in den Kern transportiert. Dort bindet er als Dimer an die palindromischen Zielsequenzen (z.B.: „Androgen Response Elements“) im Promotorbereich seiner Zielgene und bildet die Basis zur Formierung des Transkriptionskomplexes, der die Promotoraktivität initiiert. Man geht davon aus, dass der Rezeptor dabei eine Konformation annimmt, in der sein N- und C-Terminus aneinandergelagert sind, und AF-1 mit AF-2 eine gemeinsame Plattform für weitere Transkriptionsaktivatoren bilden.

Im Vergleich mit anderen Signaltransduktionswegen wie den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder den Rezeptortyrosinkinasen, erscheint die Signaltransduktion dieser Rezeptoren recht überschaubar, denn sie sind Hormonrezeptor und Transkriptionsfaktor in einem Molekül. Jedoch sind sie durch diverse Interaktionen und posttranslationale Modifikationen in das komplexe Netzwerk der Signaltransduktion eingebunden.

Unter den Zielgenen der Steroidrezeptoren wie Androgen- und Estrogenrezeptor sind diverse Vertreter der Wachstums- und Differenzierungssteuerung (Nelson *et al*, 2002; Hart *et al*, 2002). So ist zu erklären, dass sich genetische Defekte oder Mutationen dieser Rezeptoren verheerend auf die Proliferationskontrolle und Entwicklung auswirken können. Entsprechend sind die Steroidrezeptoren und ihre Kofaktoren ein wichtiges Gebiet bei der Erforschung von geschlechtsspezifischen Tumorerkrankungen wie Prostata- und Brustkrebs (Trapman, 1992; Lemieux und Fuqua, 1996).

## **1.6. Transkriptionsinitiation der Steroidrezeptoren**

Zwar hat sich das Grundkonzept der Funktion von Steroidrezeptoren seit der Postulierung durch Means *et al*. (1972) erhalten, jedoch ist gerade in den letzten Jahren das Gesamtbild wesentlich erweitert worden. Die Signaltransduktion der Kernrezeptoren wird durch Heterodimerbildung und die Einwirkungen vieler verschiedener Modifikationen und Kofaktoren mit anderen Signalwegen vernetzt und in die Gesamtsteuerung der Transkription integriert (Glass und Rosenfeld, 2000).

Die Transaktivierung resultiert dabei einerseits aus der direkten Interaktion des Rezeptors mit allgemeinen Transkriptionsfaktoren wie TFIIIF, und bereitet so die Assoziation der RNA-Polymerase II vor (Reit *et al*, 2002). Andererseits erhalten die Rezeptoren Unterstützung durch Assoziierung von Kofaktoren wie beispielsweise der SRC/p160- und der CBP/p300-Familie (Kenai *et al*, 1996; Chakravarti *et al*, 1996; McKenna und o'Malley, 2002). Man geht davon aus, dass SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator) dabei direkt mit den Rezeptoren interagiert, und sich p300 erst sekundär über SRC-1 anlagert (Sheppard *et al*, 2001). Vertreter dieser Familien sind Histonacetyltransferasen, die für eine grundlegende Auflockerung des Chromatins in der umliegenden Region sorgen, so dass sich die Elemente des allgemeinen Initiationsapparates leichter anlagern können und die Elongation erleichtert wird. Außerdem nimmt p300 über den SMCC-Komplex auch Kontakt mit der RNA-Polymerase II auf (Dilworth und Chambon, 2001). Mittlerweile ist eine große Zahl weiterer Proteine als Kofaktoren beschrieben worden. Neben Strukturproteinen, welche als Adapter funktionieren, und den Histonacetyltransferasen gibt es unter den Kofaktoren sowohl Kinasen und Phosphatasen wie Metylasen und Demetylasen, Ubiquitinligasen und die ATP-verbrauchenden Chromatinremodelling-Komplexe. Somit zeichnet sich ab, wie komplex die steroidrezeptorabhängige Transaktivierung reguliert sein muss (Moehren *et al*, 2004; Jackson, 2005).

Die transienten kovalenten Modifikationen der Histone bilden bei der Aktivierung von Genen einen epigenetischen Code, der hoch komplex erscheint und noch nicht vollständig verstanden ist. Bislang konnten nur einzelne Histonmodifikationen mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen und mit verschiedenen Chromatinstrukturen in Verbindung gebracht werden.

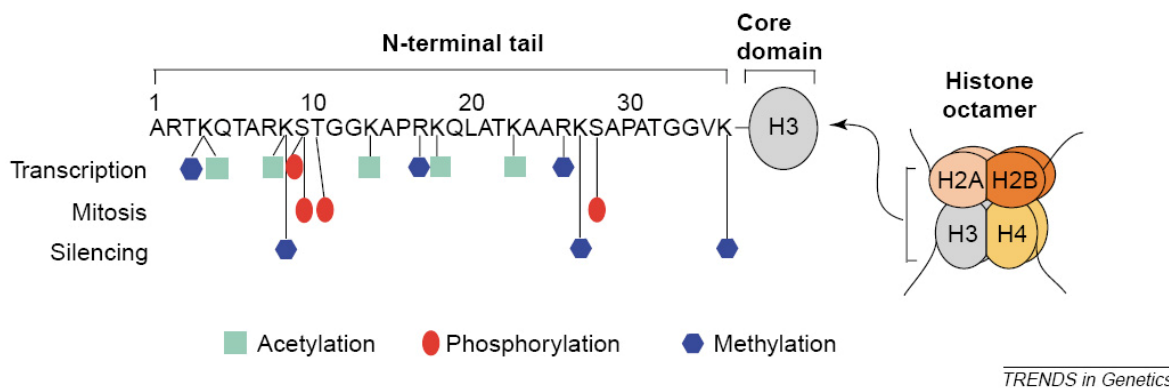
So konnte beispielsweise für androgenabhängige Promotoren gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Histone wie beispielsweise Histon H3 an Serin 10 spezifisch ist für aktive Promotor- und Enhancerbereiche (Kang *et al*, 2004). Dieser N-terminale Bereich des Histons ist nicht in die globuläre Struktur des Nukleosoms eingebunden und ragt aus der Chromatinstruktur hinaus. Man bezeichnet sie daher auch als Histonarme, deren kovalente Modifikationen das Chromatin in diesem Bereich für Umstrukturierungen vorbereiten.

Interessanterweise konnten Kang und Mitarbeiter zeigen, dass die Histonmodifikationen wie Acetylierung von Lysin 9 und Phosphorylierung von Serin 10 von Histon H3 etwa in gleicher Zeitabfolge durchgeführt werden, in denen auch Rezeptor und Kofaktoren am Promotorabschnitt des PSA-Gens erscheinen. Der PSA-Promotor ist ein streng androgenabhängiger Promotor, dessen Gen für einen viel studierten Tumormarker („Prostate Specific Antigene“) kodiert.

Das Feld der Chromatinmodifikationen ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Welche Kinasen hierbei wichtig sind und welche weiteren Histonmodifikationen es noch gibt, und vor

allein welche Funktion diese haben, ist noch nicht restlos aufgeklärt. Die aktuell akzeptierte Vorstellung ist, dass die Methylierung der Histone mit wenigen Ausnahmen eher für dichtgepackte inaktive Chromatinstrukturen charakteristisch ist (Magueron *et al*, 2005; Metzger *et al*, 2005). Methylierungen sind auch die Modifikationen mit der größten Stabilität und können auch über den Zellzyklus hinaus weitergegeben werden. Damit sind diese vor allem für Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse besonders interessant.

Die Acetylierungen und Phosphorylierungen sind dagegen weitaus dynamischer und bleiben oft nur für wenige Minuten stabil (Mellor, 2006). Ein Überblick über bekannte Histonmodifikationen, und der daran bindenden Faktoren ist am Beispiel des Histons H3 in Abb. 1.4. dargestellt. Wenn der Methylierungsgrad eine Aktivierung zulässt, werden in Abhängigkeit von aktiven Transkriptionsfaktoren Koaktivatorenzyme assoziiert, die durch Phosphorylierung und Acetylierung der Histonarme dem Chromatin Oberflächensignale verleihen, die von Adapterproteinen und Remodellierungskomplexen wie beispielsweise SWI/SNF erkannt und gebunden werden (Mellor, 2006; Jenuwei und Allis, 2001). Dies hat zur Folge, dass die dicht gepackte Anordnung des inaktiven DNA-Histon-Verbands unter ATP-Verbrauch aufgelockert und für die allgemeinen Transkriptionsfaktoren wie SP1, CREB oder TATA-Bindeproteine und andere Faktoren der TFII-Familie sowie letztendlich der RNA-Polymerase zugänglich gemacht wird.



**Abb. 1.4.: Schematische Darstellung der möglichen Histonmodifikationen am Beispiel von Histon H3** (aus Nowack und Corces, 2004). In dieser Abbildung ist der N-terminale „Histonarm“ des Histons H3 gezeigt. Methylierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen sind nach ihrer Relevanz in Transcription, Mitose oder inaktivierung (Silencing) gegliedert. Methylierungen können als Mono-, Di- oder Trimethylierungen auftreten.

Am Beispiel des Estrogenrezeptors wurden interessante neue Erkenntnisse gewonnen. Es wurde gezeigt, dass der Rezeptor und auch die Kofaktoren in zyklischen Phasen an estrogenabhängige Promotoren binden, und dass dies auch zu zyklischen Wellen von Transkriptionsaktivität führt. Hierbei wurde auch deutlich, dass zwischen initiiierenden und kontinuierlichen Kofaktoren unterschieden werden muss (Shang *et al*, 2000).

Dagegen wurde für den Androgenrezeptor am PSA-Promotor gezeigt, dass es hier deutliche Unterschiede gibt (Wang *et al*, 2004). Die Bindung an den Promotor erfolgt nicht zyklisch sondern in kontinuierlich ansteigendem Maße, bis nach 16 h das Maximum der Promotoroccupation mit aktiven Transkriptionskomplexen gemessen werden kann. Es gibt zwar gerade in den ersten 120 Minuten nach der hormonellen Induktion deutliche Schwankungen (Kang *et al*, 2004), jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt und regelmäßig wie in der estrogenabhängigen Transkription. Außerdem dauert es auch erheblich länger, bis der Promotor nach Hormonentzug wieder in seinen Ruhezustand zurückkehrt. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass PSA-Enhancer und Promotor, welche ca. 4 kb voneinander entfernt liegen, bei der Aktivierung in einer großen Schleife an einem einzigen Transkriptionskomplex gebunden vorliegen (Shang *et al*, 2002). Es wurde postuliert, dass diese Schleife dem Einfädeln und Bereithalten der RNA-Polymerase dient (Wang *et al*, 2004).

## **1.7. Medizinische Relevanz, Prostatakrebs**

Dem Androgenrezeptor wird bei der Entstehung von Prostatakrebs eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Karzinome aus dem Epithelgewebe der Prostata sind die zweithäufigste tödliche Tumorerkrankung bei Männern im europäischen und amerikanischen Bevölkerungsraum (Burke *et al*, 2005).

Im primären Erkrankungsstadium sprechen die Patienten in der Regel (60 - 70 %) gut auf einen Androgenentzug an (Salesi *et al*, 2005). In diesem Zustand bezeichnet man die Erkrankung noch als androgenabhängig. Es wird davon ausgegangen, dass das Überleben und die Proliferation der Zellen von der Expression androgenabhängiger Gene abhängig ist (Vogelzang *et al*, 1992; Siddiqui *et al*, 2004). Daher ist der Einsatz von Antagonisten oder Inhibitoren des Androgenrezeptors als chemische Kastration allgemein gebräuchlich (Tammela, 2004). Dadurch werden die schnell wachsenden Tumorzellen in die Apoptose gedrängt.

Nach kurzfristigen Erfolgen in der Therapie stellt sich jedoch bei 75 % der Patienten nach etwa zwei Jahren der Testosteronentzugstherapie ein akuter Rückfall ein (Ryan und Small, 2006). Hierbei handelt es sich dann um ein androgenunabhängig wachsendes Karzinom, welches sich wesentlich aggressiver ausbreitet und bei 90 % der Fälle letal endet (Gronau *et al*, 2005). In diesem Stadium ist eine Therapie nur noch mit allgemeinen Chemotherapeutika, sowie mit Bestrahlung möglich (Pollack und Zagars, 1997).

Es wird vermutet, dass die anfänglich gut anschlagende Antiandrogentherapie auf viele Tumorzellen hauptsächlich cytostatisch wirkt. Obwohl der Ausfall der



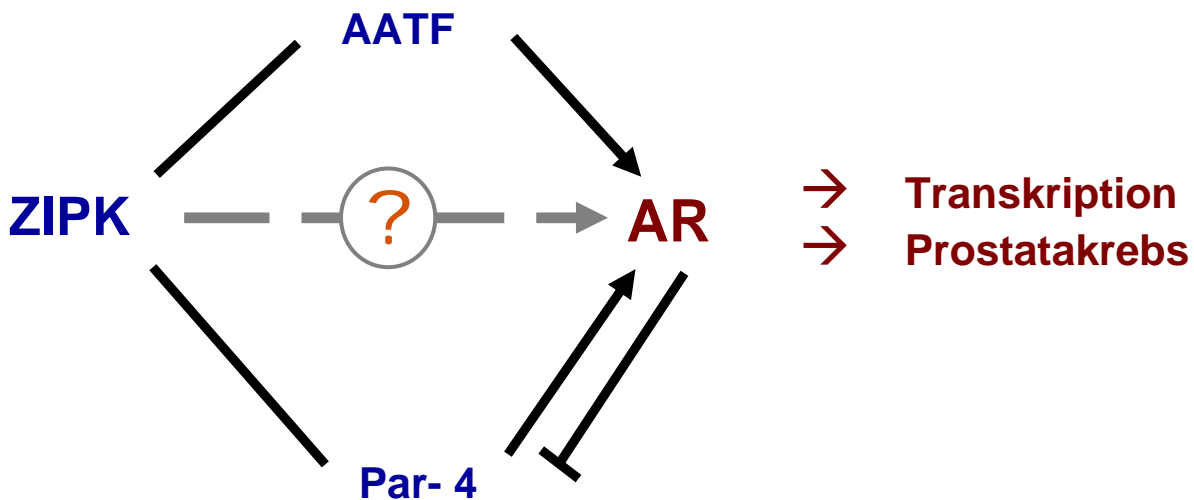
Androgenrezeptoraktivität die meisten schnellwachsenden Zellen in die Apoptose (möglicherweise Par-4 vermittelt) treibt, bleiben in den meisten Fällen Subpopulationen erhalten. Diese besitzen nach wie vor ein hohes Proliferationspotential und können offenbar mit statistischer Regelmäßigkeit innerhalb weniger Jahre die Fähigkeit entwickeln, an androgenabhängigen Promotoren auch ohne den aktivierten Rezeptor funktionelle Transkriptionskomplexe zu bilden (FitzGerald *et al*, 2004), und so die Wachstumshürde zu überwinden.

Hierzu hat sich gezeigt, dass auch Antagonist-gebundene Rezeptoren an „Response Elemente“ binden können (Kang *et al*, 2004). Dort assoziieren sie zwar in Zellkulturexperimenten repressorische Kofaktoren, es wäre aber denkbar, dass *in vivo* etwa nach einigen Mutationen oder veränderter Kofaktorexpression auch Aktivatoren assoziiert werden könnten.

Vielversprechende Ergebnisse wurden erreicht, als im ersten Stadium die Antiandrogentherapie mit konventionellen Medikamenten der Chemotherapie kombiniert wurde. Hierdurch wurde die Rückfallquote deutlich gesenkt (Syed *et al*, 2003). Obwohl Prostatakarzinome im ersten Stadium noch nicht direkt lebensbedrohlich sind, fokussiert sich die medizinische Grundlagenforschung auf dieses Stadium, denn es erscheint sinnvoll die Erkrankung möglichst schon in diesem Stadium zu verstehen, und die fehlgesteuerten Zellen möglichst vollständig und nachhaltig zu eliminieren.

## 1.8. Zielsetzung dieser Arbeit

Die Charakteristik der Interaktionspartner eines neuen Proteins gibt oft Aufschluss über das funktionelle Umfeld, in dem es wirksam ist. Im Fall der ZIPK sind diverse Interaktionen mit transkriptionsrelevanten Proteinen beschrieben. Für ATF4, AATF, CDC5, STAT3, Daxx und auch Par-4 sind verschiedene Effekte in der Transkriptionsregulation beschrieben.



**Abb. 1.4.: Schema des Bezugs der ZIPK auf Kofaktoren des AR.** Das Schema zeigt die bekannten Verknüpfungen, welche die ZIPK in die Nähe der vom Androgenrezeptor (AR) vermittelten Transkription bringen. Der graue Pfeil mit dem Fragezeichen markiert die Fragestellung dieser Arbeit grafisch.

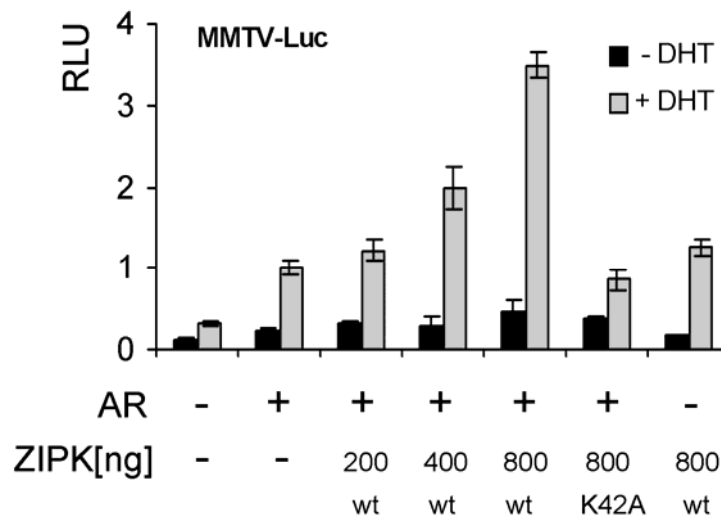
Für AATF und Par-4 ist ein Bezug speziell in der androgenrezeptorvermittelten Transkriptionssteuerung beschrieben. Zusätzlich besteht auch eine enge Verbindung zwischen STAT3 und dem Androgenrezeptor in der Transkriptionssteuerung. In ihrer Summe legen diese Verknüpfungen eine Beteiligung der ZIPK an diesen Transkriptionsprozessen nahe.

In der vorliegenden Arbeit werden nun verschiedene molekularbiologische Experimente vorgestellt, die eine Funktion der ZIPK in der androgenabhängigen Transkription belegen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. ZIPK steigert die androgenabhängige Transkription

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich bereits feststellen, dass die transiente Expression der ZIPK die Aktivität des Androgenrezeptors steigert. Dazu wurde ein MMTV-Luciferase-Konstrukt verwendet, das mit steigenden Mengen Flag-ZIPK Expressionsplasmid und einem Androgenrezeptorexpressionsplasmid in Rat1-Zellen kotransfiziert wurde. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit DHT induziert und die Luciferaseaktivität gemessen. Abb 2.1.1. zeigt die relative Steigerung der MMTV-Promotoraktivität durch die Expression der ZIPK.



**Abb. 2.1.1: Die Expression der ZIPK steigert die Androgen induzierte Aktivität des MMTV-Promotors.**

Rat1-Zellen wurden kotransfiziert mit 600 ng MMTV-Luciferase-Reporter, 400 ng Flag-Androgenrezeptor und steigenden Mengen Flag-ZIPK-Expressionsvektor. Die Zellen wurden 24 h mit 10 nM DHT induziert. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist als Vielfaches der Basisaktivität des AR ohne ZIPK aufgetragen. Die Reporteraktivität wird durch die Expression der ZIPK bis zu 3,5-fach gesteigert. Die Steigerung ist mengen- und hormonabhängig. Die ZIPK-K42A zeigt keinen Effekt.

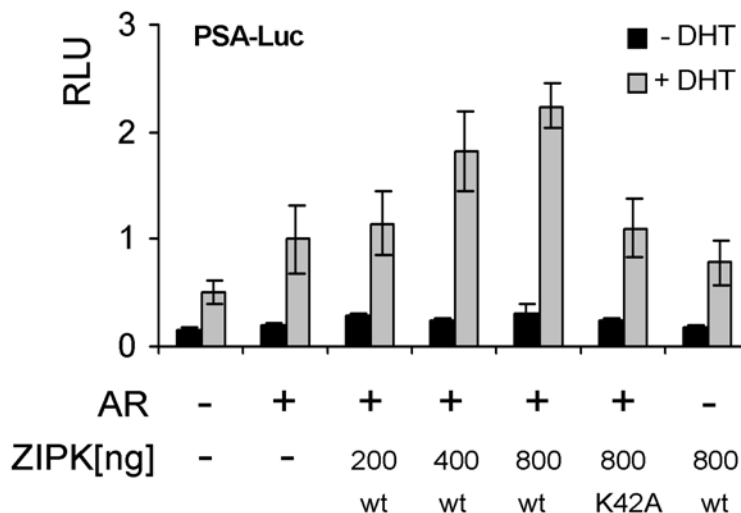
Die Luciferaseaktivität konnte mengenabhängig bis auf das Vierfache gesteigert werden. Dieser Effekt war nur messbar, wenn gleichzeitig der Androgenrezeptor koexprimiert wurde, denn der endogene Rezeptor bewirkt bei der relativ großen Menge an Reporterkonstrukten keinen nennenswerten Effekt. Ebenfalls zeigte sich hier eine strikte Hormonabhängigkeit.

Um zu untersuchen, welche Rolle hierbei die enzymatische Aktivität der ZIPK spielt, wurde auch die punktmutierte Variante ZIPK-K42A eingesetzt, bei der ein essentielles Lysin in der ATP-Binderegion der Kinasedomäne mutiert, und die Kinase somit inaktiv ist.

Interessanterweise zeigte diese keinen Steigerungseffekt. Hierdurch wurde deutlich, dass die Funktion der ZIPK in der Transkription auf Phosphorylierung beruht.

Darauf aufbauend wurde untersucht, ob der am MMTV-Promotor gemessene Koaktivatoreffekt der ZIPK auch an anderen Androgenrezeptor abhängigen Promotoren messbar ist.

Der Promotor des PSA-Gens ist ein vielbeschriebenes Beispiel für endogene Testosteron abhängige Promotoren und ist aufgrund der Tumorsignifikanz in vielen Arbeiten untersucht worden. Aus genomischer DNA von HeLa-Zellen wurde der 642 bp große Proximalbereich des PSA-Promotors mittels PCR amplifiziert und in den pGL3-Luciferase Vektor einkloniert. In Rat1-Zellen wurde das Reporterkonstrukt zusammen mit dem Androgenrezeptor und verschiedenen Mengen ZIPK kotransfiziert und die Luciferase-aktivität gemessen. Abb. 2.1.2. zeigt, dass auch am PSA-Promotor eine Erhöhung der Promotoraktivität in Abhängigkeit der ZIPK-Expression zu verzeichnen war. Die Hormonabhängigkeit ist auch hier ein weiterer Hinweis auf einen spezifischen Effekt.



**Abb. 2.1.2.: Die Expression der ZIPK steigert die Androgen induzierte Aktivität des PSA-Promotors.**

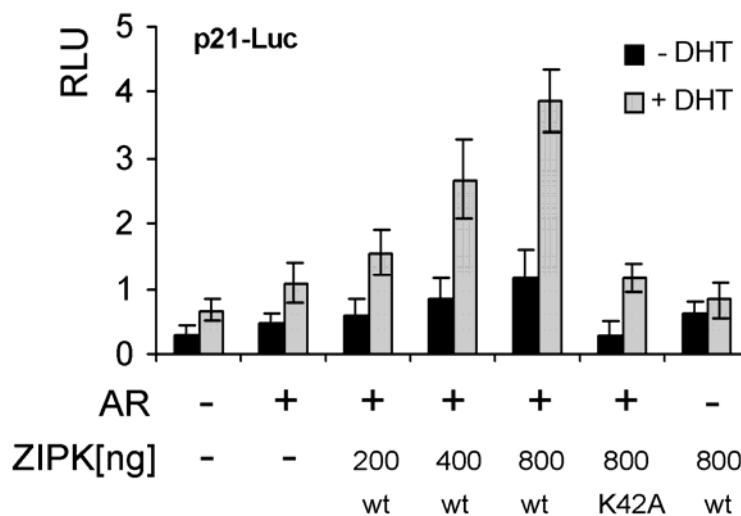
Rat1-Zellen wurden kotransfiziert mit 600 ng PSA-Luciferase-Reporter, 400 ng Flag-AR und steigenden Mengen Flag-ZIPK-Expressionsvektor. Zellen wurden 24 h mit 10 nM DHT induziert. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist als Vielfaches der Basisaktivität des AR ohne ZIPK aufgetragen. Die Reporteraktivität wird durch die Expression der ZIPK bis zu 2,5-fach gesteigert. Die Steigerung ist mengen- und hormonabhängig. Die ZIPK-K42A zeigt keinen Effekt.

Der PSA-Promotor lieferte jedoch generell nur schwache Luciferaseaktivitäten, die etwa 1/10 der Aktivität des MMTV-Promotors betragen.

In unserem Labor war außerdem ein p21-Luciferase-Konstrukt vorhanden. Das p21-Gen besitzt einen gut untersuchten p53-Responsepromotor, der aber auch über eine Bindungsstelle für den Androgenrezeptor („Androgen Response Element“) verfügt. Das

Protein p21 ist ein potenter CDK-Inhibitor und fungiert in den meisten Gewebetypen als Tumorsuppressor, in dem es den Zellzyklus blockiert. p21 hat aber auch antiapoptotische Funktionen, und spielt eine Rolle als Überlebensfaktor von verschiedenen Krebstypen (Fizazi *et al*, 2002; Martinez *et al*, 2002).

Daher wurde untersucht, ob auch hier die androgenabhängige Transkription durch die Koexpression mit der ZIPK beeinflusst wird. Wie zuvor wurden die Plasmide transient transfiziert und die Transkription mit DHT induziert.

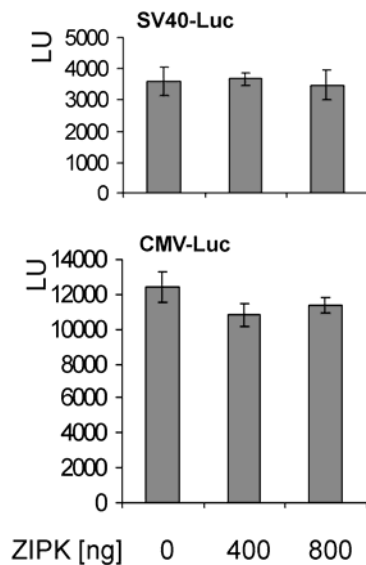


**Abb. 2.1.3.: Die Expression der ZIPK steigert die Androgen induzierte Aktivität des p21-Promotors.**

Rat1-Zellen wurden kotransfiziert mit 600 ng p21-Luciferase-Reporter, 400 ng Flag-AR und steigenden Mengen Flag-ZIPK-Expressionsvektor. Zellen wurden 24 h mit 10 nM DHT induziert. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist als Vielfaches der Basisaktivität des AR ohne ZIPK aufgetragen. Die Reporteraktivität wird durch die Expression der ZIPK bis zu 4-fach gesteigert. Die Steigerung ist mengen- und hormonabhängig. Die ZIPK-K42A zeigt keinen Effekt.

Es zeigte sich dass auch hier eine Steigerung der Promotoraktivität durch Koexpression der ZIPK mit dem Androgenrezeptor bewirkt wurde (Abb. 2.1.3.). Auch hier war der Effekt nur mit dem Wildtyp zu verzeichnen und nicht beim Einsatz der inaktiven K42A-Mutante. Der Effekt scheint auch hier zum größten Teil hormonabhängig zu sein, es fällt jedoch auf, dass im Falle des p21-Promotors auch die nicht induzierten Proben eine merkliche Steigerung der Luciferaseaktivität zeigten. Dieses Ergebnis kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die ZIPK möglicherweise auch einen Effekt auf andere endogene Transkriptionsfaktoren hat. Dieser Aspekt wird in Abschnitt 2.2.3. näher beschrieben.

Da es sich bei der Koaktivierung durch die ZIPK auch um einen allgemeinen zellbiologischen Effekt der ZIPK handeln könnte, wurden zusätzlich Transaktivierungsexperimente mit dem viralen CMV- und dem SV40-Promotor durchgeführt (Abb 2.1.4.).



**Abb. 2.1.4.: Die Expression der ZIPK beeinflusst nur androgenabhängige Promotoren.**

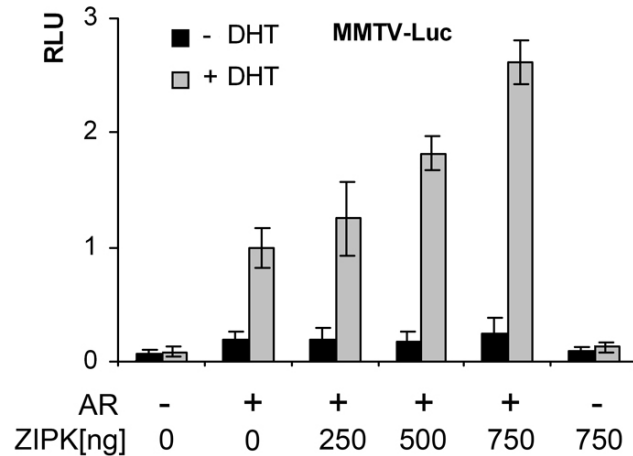
HEK293-Zellen wurden kotransfiziert mit 800 ng des jeweiligen Luciferasereporters und steigenden Mengen Flag-ZIPK-Expressionsvektor. Zellen wurden nach 48 h geerntet und die Luciferaseaktivität (LU= Luciferase Units) bestimmt. Die Reporteraktivität wird durch die Expression der ZIPK nicht beeinflusst.

Hierbei zeigte sich aber kein messbarer Effekt durch die Expression der ZIPK. Also scheint es sich um einen spezifischen Effekt auf ausgewählte Transkriptionsfaktoren wie den Androgenrezeptor zu handeln.

Es konnte in diesem Abschnitt insgesamt gezeigt werden, dass die ZIPK die Aktivität androgenabhängiger Promotoren dosis- und hormonabhängig verstärkt. Die Kinase zeigte im Rahmen dieser Transaktivierungsexperimente die typische Eigenschaft eines Koaktivators. Die Ergebnisse am p21-Promotor deuten aber auch an, dass noch weitere Transkriptionsfaktoren von der ZIPK unterstützt werden könnten.

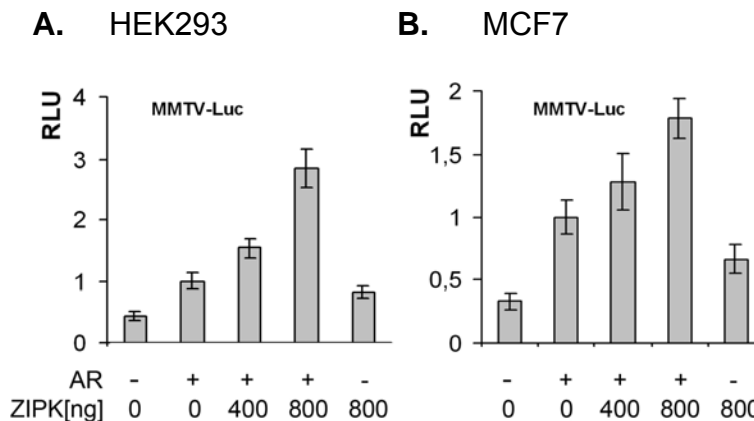
### **2.1.1. Der Steigerungseffekt der ZIPK ist auch in anderen Zelllinien messbar**

Um zu untersuchen ob es sich hierbei möglicherweise um einen zelltypspezifischen Effekt handelt, wurden auch in anderen gängigen Zelllinien Transaktivierungsexperimente durchgeführt. Zunächst wurden PC3-Zellen untersucht, denn diese exprimieren keinen endogenen Androgenrezeptor und eignen sich somit gut um die Abhängigkeit vom Androgenrezeptor zu zeigen. PC3-Zellen wurden entsprechend mit dem MMTV-Luciferasekonstrukt, dem Expressionsplasmid für den Androgenrezeptor und der ZIPK kotransfiziert (Abb 2.1.5.). Es zeigte sich auch hier eine hormon- und mengenabhängige Steigerung der MMTV-Promotoraktivität, die eindeutig androgenspezifisch war.



**Abb. 2.1.5.:** Die Expression der ZIPK steigert die androgeninduzierte Promotoraktivität auch in PC3-Zellen. PC3-Zellen wurden kotransfiziert mit 900 ng MMTV-Luciferase-Reporter, 300 ng Flag-AR und steigenden Mengen Flag-ZIPK-Expressionsvektor. Zellen wurden 24 h mit 10 nM DHT induziert. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist als Vielfaches der Basisaktivität des AR ohne ZIPK aufgetragen. Die Reporteraktivität wird auch in diesen Zellen durch die Expression der ZIPK gesteigert. Die Steigerung ist mengen- und hormonabhängig. In diesen AR-negativen Zellen fallen die Kontrollen ohne AR besonders eindeutig negativ aus.

Dazu wurden ebenfalls vergleichbare Experimente in MCF7- und HEK293-Zellen durchgeführt (Abb. 2.1.6.), um zu untersuchen, ob der Effekt der ZIPK auch in diesen Zelllinien messbar ist.



**Abb. 2.1.6.:** Der Koaktivatoreffekt der ZIPK ist auch in HEK293- und MCF7-Zellen messbar.

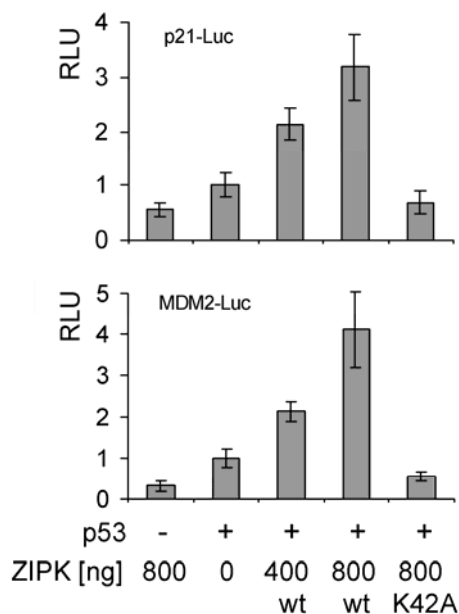
HEK293- (A) und MCF7-Zellen (B) wurden kotransfiziert mit 800 ng MMTV-Luciferase-Reporter, 200 ng Flag-AR und steigenden Mengen Flag-ZIPK-Expressionsvektor. Zellen wurden 24 h mit 10 nM DHT induziert. Auch in diesen Zelllinien ist der Effekt der ZIPK auf den MMTV-Promotor messbar. In den MCF7-Zellen ist der Effekt deutlich schwächer.

Die von der ZIPK bewirkte Steigerung der androgenabhängigen Transkription konnte auch in HEK293-Zellen und, wenn auch etwas schwächer, ebenfalls in MCF7-Zellen gemessen

werden. Es handelt sich also offenbar um einen Effekt, der nicht zelltypspezifisch ist, sondern eher generell bei androgenabhängigen Promotoren zum Tragen kommt. Im Weiteren wurde hauptsächlich mit HEK293-Zellen gearbeitet, da diese besonders effektiv und zuverlässig zu transfizieren sind.

### 2.1.2. Auch die p53-abhängige Transkription wird von der ZIPK verstärkt

Bekanntester Transkriptionsfaktor für den p21-Promotor ist p53. Es wurde daher untersucht, ob die ZIPK auch in Koexpression mit dem Tumorsuppressor p53 zu einer Steigerung der p21-Promotoraktivität führt. Dazu wurden HEK293-Zellen mit einem p53-Expressionsplasmid zusammen mit steigenden Mengen ZIPK kotransfiziert und nach 48 h die Luciferaseaktivität der Zellextrakte gemessen. Abb 2.1.7. zeigt, dass die ZIPK auch in Koexpression mit p53 eine deutliche, dreifache Steigerung der p21-Promotoraktivität bewirkt.



**Abb. 2.1.7.: Die Expression der ZIPK steigert die Aktivität p53-abhängiger Promotoren.**

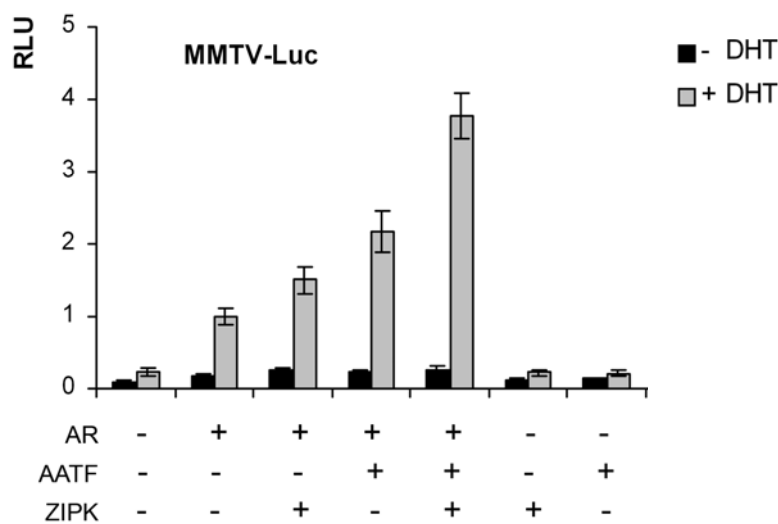
HEK293-Zellen wurden kotransfiziert mit 800 ng p21- oder MDM2-Luciferase-Reporter, 150 ng p53 und steigenden Mengen Flag-ZIPK-Expressionsvektor. Zellen wurden nach 48 h geerntet und die Luciferaseaktivität bestimmt. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist als Vielfaches der Basisaktivität von p53 ohne ZIPK aufgetragen. Die Reporteraktivität beider Promotoren wird in Anwesenheit von p53 dosisabhängig durch die ZIPK verstärkt.

Zusätzlich wurde das gleiche Experiment mit einem weiteren klassischen p53-Promotor, dem des MDM2-Gens durchgeführt. Dabei konnte auch die Aktivität des MDM2-Luciferase-Konstruktes durch die Expression der ZIPK bis auf das Vierfache erhöht werden. Wie beim Zusammenspiel mit dem Androgenrezeptor ist auch hier die Steigerung nur mit der aktiven Kinase messbar, und damit auf die Phosphorylierungsaktivität der ZIPK zurückzuführen.



### 2.1.3. Kooperation mit AATF in der androgenabhängigen Transaktivierung

AATF wurde als Interaktionspartner der ZIPK gefunden und ist unter anderem als Koaktivator des Androgenrezeptors charakterisiert (Burgdorf *et al*, 2004). Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob ZIPK und AATF in einem gemeinschaftlichen Mechanismus die androgenabhängige Transkription begünstigen. Dazu wurden HEK293-Zellen mit verschiedenen Kombinationen der Expressionsplasmide für Androgenrezeptor, ZIPK und AATF sowie dem MMTV-Luciferasereporter transfiziert und mit DHT induziert (Abb. 2.1.8.).



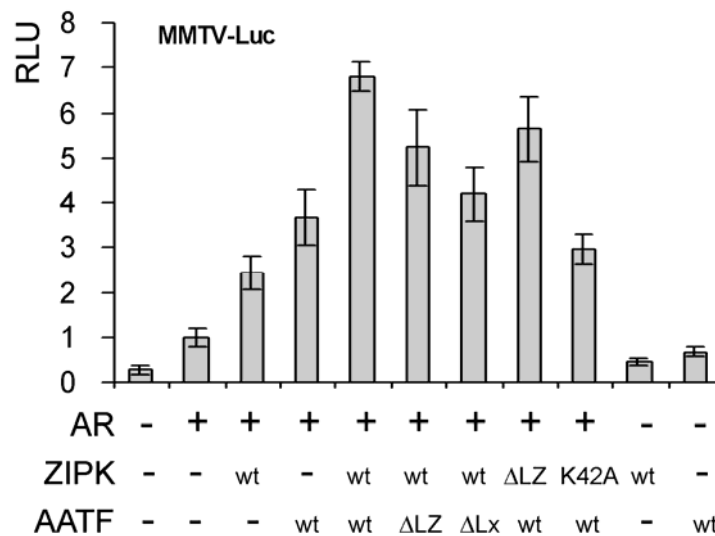
**Abb. 2.1.8.: Die Expression der ZIPK steigert die Androgen induzierte Aktivität des p21-Promotors.**

HEK293-Zellen wurden kotransfiziert mit 800 ng MMTV-Luciferase-Reporter, 250 ng Flag-AR und verschiedenen Kombinationen von ZIPK und AATF. Zellen wurden 24 h mit 10 nM DHT induziert. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist als Vielfaches der Basisaktivität des AR ohne ZIPK aufgetragen. ZIPK und AATF zeigen eine kooperative Steigerung der Promotoraktivität.

Während die ZIPK in diesem Experiment alleine nur eine geringfügige, etwa 1,5-fache Steigerung der Promotoraktivität bewirkte, war der Einfluss von AATF deutlich größer, etwa eine Verdoppelung der Luciferaseaktivität. Diese konnte jedoch in Koexpression mit der ZIPK noch einmal deutlich auf beinahe das Vierfache gesteigert werden. Da die ZIPK in Koexpression mit AATF einen deutlich höheren Effekt auf die Promotoraktivität hatte, deutet dieses Ergebnis tendenziell auf eine kooperative Koaktivierung hin.

In Hefeexperimenten wurde mittels des Zwei-Hybridsystems gezeigt, dass AATF und ZIPK mit Hilfe ihrer Leucinzipper interagieren (Page *et al*, 1999). Da wir aus vorangegangenen Untersuchungen über eine breite Palette an mutierten Varianten verfügen, wurde im folgenden Versuch neben der bekannten K42A-Version der ZIPK auch eine  $\Delta$ LZ-Mutante

eingesetzt, bei welcher der C-terminale Leucinzipper deletiert ist. Von AATF wurde zum einen ebenfalls eine  $\Delta$ LZ-Variante eingesetzt, deren mittig gelegener Leucinzipper durch den Austausch von zwei Leucinresten zerstört wurde. Da sich in diesem Bereich auch das mittlere Lx-Motiv befindet, ist dies ebenfalls defekt. Desweiteren wurde die Dreifachmutante AATF  $\Delta$ Lx, bei der neben der Leucinzipper-Mutation auch noch die beiden N- und C-terminalen Lx-Motive mittels Punktmutation inaktiviert wurden, eingesetzt. Verschiedene Kombinationen dieser Konstrukte wurden zusammen mit dem Androgenrezeptor/MMTV-Luc-Reportersystem in HEK293-Zellen transfiziert und induziert (Abb. 2.1.9.).



**Abb. 2.1.9.: Die Kooperation von ZIPK und AATF ist nur zum Teil auf die Leucinzipper angewiesen.**

HEK293-Zellen wurden kotransfiziert mit 800 ng MMTV-Luciferase-Reporter, 200 ng Flag-AR und verschiedenen Mutanten von AATF und ZIPK.  $\Delta$ LZ= Leucinzipper defekt (AATF) oder deletiert (ZIPK),  $\Delta$ Lx= Lx-Motive inaktiviert. Zellen wurden 24 h mit 10 nM DHT induziert. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist als Vielfaches der Basisaktivität des AR ohne ZIPK aufgetragen.

Bei der Expression der „Wild-Typ“-Proteine ergibt sich das gezeigte Bild, die Promotoraktivität wurde hier sogar mehr als versechsfacht. Weiter zeigte sich, dass die Deletion oder Inaktivierung der gemeinsamen Interaktionsdomäne nur eine geringfügige Reduktion der gemeinschaftlichen Koaktivierung bewirkt. Etwas deutlicher fiel die Inaktivierung aller drei Lx-Motive bei AATF ins Gewicht. Die Promotoraktivität wurde hierbei um etwa ein Drittel reduziert. Am stärksten reduzierte sich die Reporteraktivität, wenn die kinaseinaktive Mutante K42A eingesetzt wurde. Der Wert lag sogar unter dem Aktivitätswert von AATF und Androgenrezeptor ganz ohne die ZIPK, was zeigt, dass auch die Kooperation zwischen AATF und ZIPK auf die enzymatische Aktivität der Kinase angewiesen ist.

Es ließ sich somit feststellen, dass die ZIPK und ihr Interaktionspartner AATF einen kooperativen Steigerungseffekt auf die Aktivität androgenabhängiger Reporterkonstrukte

haben. Der jeweilige Leucinzipper scheint dabei weniger von Bedeutung zu sein als die Lx-Motive seitens AATF und die enzymatische Aktivität der Kinase.

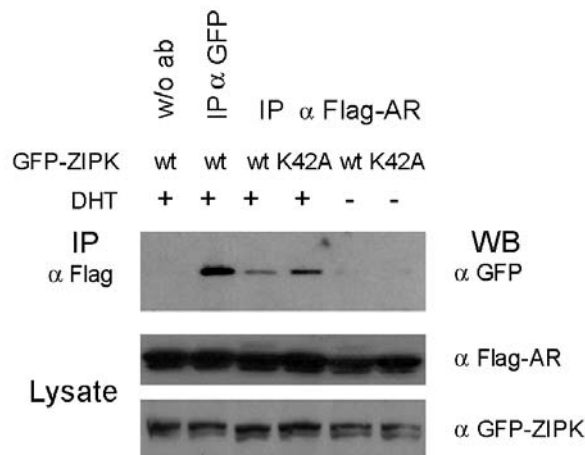
## **2.2. Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen ZIPK und dem Androgenrezeptor**

Die bis hier gesammelten Ergebnisse der Transaktivierungsstudien deuteten darauf hin, dass es möglicherweise eine funktionelle Beziehung zwischen der ZIPK und dem Androgenrezeptor gibt. Daher schien es wahrscheinlich, dass die beiden Proteine in der Zelle einen physischen Kontakt eingehen. Im folgenden Abschnitt werden daher ZIPK und der Rezeptor auf eine Interaktion hin untersucht.

Zunächst wurde im Hefe-Zwei-Hybridsystem ZIPK- und AR-Fusionsproteine auf Interaktion hin getestet. Es konnte jedoch kein Hefewachstum festgestellt werden, welches auf eine Interaktion hindeutet. Weiter wurden mittels eines GST-ZIPK-Fusionsproteins GST-Pull-down-Versuche mit *in vitro* translatiertem Androgenrezeptor durchgeführt. Es konnte jedoch auch hier keine direkte *in vitro* Interaktion nachgewiesen werden. Obwohl anhand dieser Experimente die Vermutung einer Interaktion nicht untermauert werden konnte, war eine Interaktion *in vivo* nicht ausgeschlossen. Es wäre möglich, dass zum einen die Fusionspartner im Hefeexperiment die Bindung stören könnten. Zum anderen wäre es möglich, dass der Androgenrezeptor *in vitro* nicht seine natürliche Konformation annimmt, da hier Chaperone und weitere Kofaktoren fehlen könnten.

Um die beiden Proteine auf eine mögliche Interaktion *in vivo* hin zu untersuchen, wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt (Abb. 2.2.1.). Dazu wurde „Flag-markierter“ Androgenrezeptor und GFP-ZIPK in HEK293-Zellen transfiziert und für 90 min mit DHT induziert. Aus den Lysaten wurde mittels anti-Flag-Antikörper der ektopisch exprimierte Androgenrezeptor präzipitiert und die Eluate im Western Blot auf kopräzipitierte GFP-ZIPK untersucht.

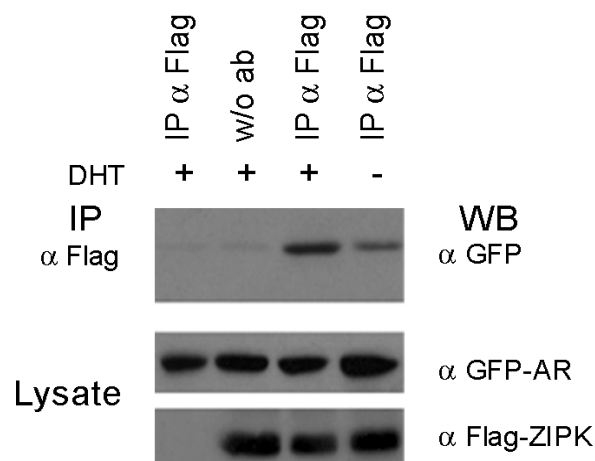
Die unteren beiden Bandenreihen in Abb. 2.2.1. zeigen die gleichmäßige Expression von Flag-Androgenrezeptor und GFP-ZIPK in den Zelllysaten, die zur IP verwendet wurden. Im oberen Streifen ist in den vier Spuren auf der rechten Seite die kopräzipitierte ZIPK zu sehen. Es lässt sich erkennen, dass die ZIPK nur in den Proben, die zuvor mit DHT induziert wurden, mit aufgereinigt wurde.



**Abb. 2.2.1.: Die ZIPK kopräzipitiert hormonabhängig mit dem Androgenrezeptor.**

HEK293-Zellen wurden mit Flag-Androgenrezeptor und GFP-ZIPK, wt oder K42A kotransfiziert. Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für 90 min mit 10 nM DHT induziert. Die IP wurde durchgeführt mit anti-Flag-Antikörper. Die ZIPK wird nur nach vorheriger Induktion mitpräzipitiert. Negativkontrolle ohne (w/o) Antikörper, Positivkontrolle mit anti-GFP-Antikörper.

Interessanterweise scheint die Mutante K42A eine stabilere Bindung mit dem Androgenrezeptor einzugehen. In den zwei Spuren links sind zum einen die Negativkontrolle, bei der mit Hormon aber ohne spezifischen Antikörper gearbeitet wurde zu sehen, und eine Positivkontrolle, bei der ein anti-GFP-Antikörper zur direkten Präzipitation der ZIPK eingesetzt wurde.



**Abb. 2.2.2.: Der Androgenrezeptor kopräzipitiert mit der ZIPK.**

Reziproker Ansatz zu Abb. 2.2.1., HEK293-Zellen wurden kotransfiziert mit GFP-Androgenrezeptor und Flag-ZIPK. Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für 90 min mit 10 nM DHT induziert. IP wurde durchgeführt mit anti-Flag-Antikörper. Der Rezeptor wird nach vorheriger Induktion deutlich stärker mit aufgereinigt, Spur 3 und 4 Negativkontrolle, Spur 1: ohne ZIPK, Spur 2: ohne (w/o) Antikörper.

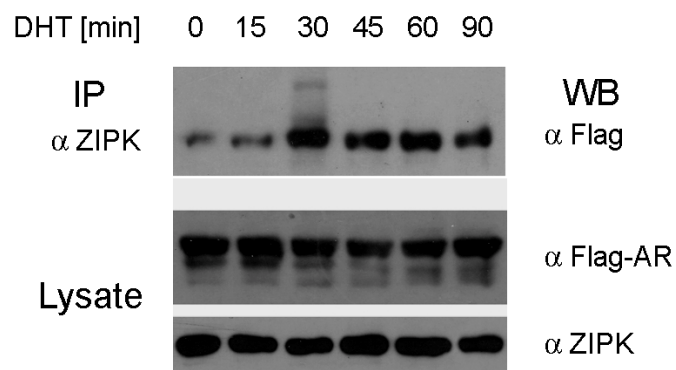
Um den Befund zu erhärten, wurde in einem weiteren Experiment die Immunpräzipitation mit vertauschten Markierungen der Proteine durchgeführt. Entsprechend wurde ein GFP-AR-Fusionsprotein mit Flag-markierter ZIPK koexprimiert. Auch in dieser Orientierung zeigte der Western Blot, dass der Androgenrezeptor hormonabhängig an die präzipitierte ZIPK gebunden hat.

Wie in Abb. 2.2.2. zu sehen ist, konnte auch in dieser Orientierung eine Bindung der ZIPK an den Rezeptor gezeigt werden. Zwar war in diesem Experiment auch eine Bindung ohne Hormon zu sehen, diese wurde jedoch bei Hormonzugabe deutlich stärker und untermauert so die Hormonabhängigkeit der Interaktion. Die Negativkontrollen ohne Antikörper und ohne transfizierte Flag-ZIPK unterstützen zusätzlich die Spezifität des Ergebnisses.

Hierbei handelt es sich um die ersten Ergebnisse, welche die Annahme eines physischen Komplexes unter Beteiligung von Androgenrezeptor und ZIPK unterstützen.

### 2.2.1. Die Bindungsdynamik der ZIPK an den Androgenrezeptor

Im Rahmen der vorherigen Immunpräzipitationen konnte festgestellt werden, dass eine längere Vorbehandlung der Zellen mit DHT die Bindung von Kinase und Rezeptor nicht weiter verstärkt. Daher erschien es interessant gerade im Zeitraum der ersten 90 Minuten zu untersuchen wie schnell die Interaktion nach hormoneller Induktion nachweisbar ist.



**Abb. 2.2.3.: Die ZIPK kopräzipitiert mit dem Androgenrezeptor nach hormoneller Induktion.**

HEK293-Zellen wurden transfiziert mit Flag-Androgenrezeptor. Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für 90 min mit 10 nM DHT induziert. IP wurde durchgeführt mit anti-ZIPK-Antikörper. Der Androgenrezeptor wird schon nach 30 min am deutlichsten mit aufgereinigt. Nach 90 min beginnt bereits ein leichter Rückgang.

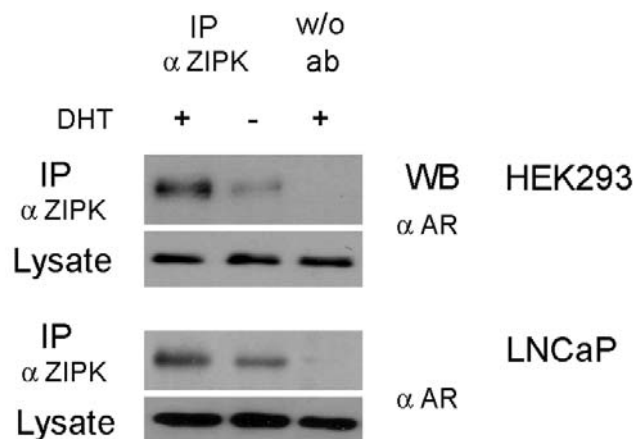
Dazu wurde Flag-Androgenrezeptor in HEK293-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit DHT stimuliert, und die Lysate zu den in Abb 2.2.3. angegebenen Zeitabständen auf eine Interaktion zwischen Rezeptor und Kinase hin analysiert. Dazu wurde aus den Zellextrakten

die endogene ZIPK mittels anti-ZIPK-Antikörper präzipitiert und die dabei kopräzipitierte Menge Flag-Androgenrezeptor im Western Blot detektiert.

In der oberen Bandenreihe ist zu sehen, dass die Menge des mitgereinigten Rezeptors schon nach 30 Minuten schlagartig zu ihrem Maximum ansteigt. Die Bandenstärke hielt sich in den Proben von 45 und 60 Minuten relativ konstant, während nach 90 Minuten sogar ein leichter Rückgang zu verzeichnen war. Es handelt sich also offenbar beim Zusammenspiel von Androgenrezeptor und der ZIPK um eine sehr dynamische Interaktion. Da der Androgenrezeptor selbst erst etwa 20 bis 30 Minuten nach der Induktion am Promotor nachgewiesen werden kann (Kang *et al*, 2004), scheint ZIPK an sehr frühen Ereignissen der Transkriptionsinitiation beteiligt zu sein.

### 2.2.2. Auch die endogenen Kinase- und Rezeptorproteine interagieren

Bei Koimmunpräzitationen von ektopisch exprimierten Proteinen treffen unnatürlich große Mengen der Proteine in einer Zelle aufeinander. Dadurch besteht die Gefahr der Artefaktbildung, da auch niederaffine Bindungen detektiert werden könnten. Daher wurden im Folgenden Immunpräzitationen aus Extrakten untransfizierter HEK293-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden 48 Stunden unter hormonfreien Bedingungen gehalten und vor der Ernte teilweise mit DHT für 45 Minuten induziert. Hierbei ist zu vermerken, dass die fünffache Menge an Zellen verwendet wurde im Vergleich zu den vorherigen Experimenten mit transfizierten Proteinen.



**Abb. 2.2.4.: Koimmunpräzitation mit den endogenen Proteinen.**

HEK293- und LNCaP-Zellen wurden zwei Tage unter hormonfreien Bedingungen gehalten und vor der Ernte 45 min mit 10 nM DHT induziert. IP wurde durchgeführt mit anti-ZIPK-Antikörper. Der Androgenrezeptor wird nach vorheriger Induktion deutlich stärker mitgereinigt. Negativkontrolle ohne (w/o) Antikörper.

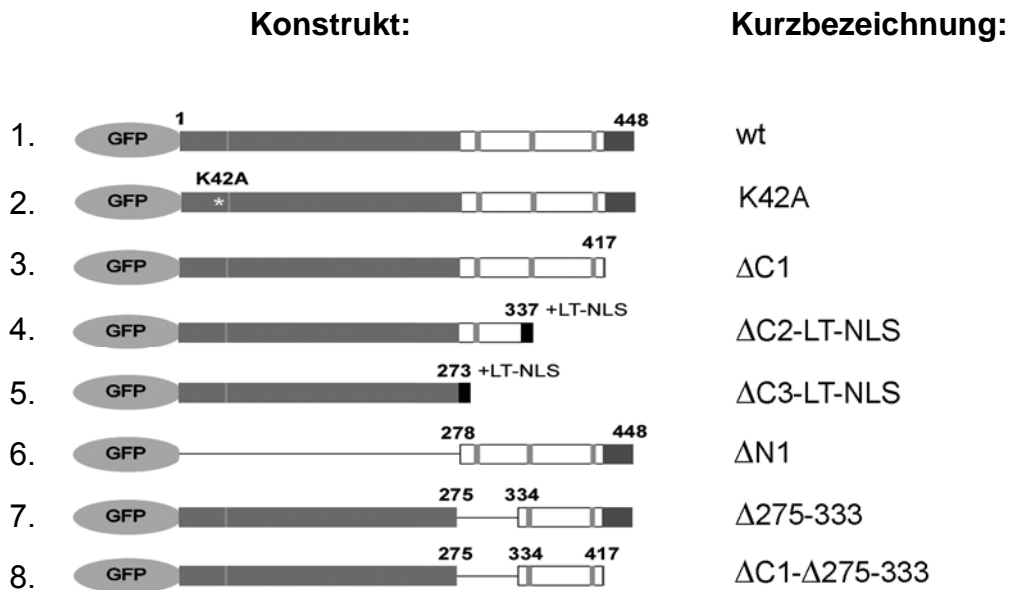
Die endogene ZIPK der Zellen wurde mit spezifischem Antikörper präzipitiert und das Eluat im Western Blot mittels anti-AR-Antikörper detektiert. In Abb. 2.2.4.A ist zu sehen, dass sich auch die endogenen Proteine nach hormoneller Induktion gemeinsam präzipitieren ließen. Ohne Hormonzugabe fiel die Bande schon deutlich schwächer aus. Die Negativkontrolle ohne Antikörper zeigte, dass es sich hierbei um eine ZIPK-spezifische Bindung handelt. Abb. 2.2.4.B zeigt, dass sich ein vergleichbares Ergebnis unter Verwendung von LNCaP-Zellen ergibt. Diese sind in diesem Zusammenhang besonders interessant, weil sie als gut untersuchtes Modellsystem für hormonabhängige Prostatakarzinome anerkannt sind. Sie zeigen nur in Anwesenheit von Testosteron im Medium Wachstum. Damit konnte gezeigt werden, dass sich der Androgenrezeptor gemeinsam mit der ZIPK auch aus induzierten LNCaP-Zellen präzipitieren lässt.

### **2.3. Kartierung der Interaktionsdomäne der Kinase**

Das Kartieren der Interaktionsdomänen ist interessant, weil sich dadurch oft neue Einsichten in die molekulare Mechanik der Proteininteraktion ergeben.

Im Abschnitt 2.1.4. wurde bereits anhand von Transaktivierungsdaten gezeigt, dass die Deletion des Leucinzippers der ZIPK alleine nicht ausreicht um ihre Koaktivatorfunktion in der Transkription zu unterbinden. Mit ihrem Leucinzipper könnte die Kinase zwar über AATF an den aktiven Rezeptor assoziiert werden, aber es könnten auch andere Domänen an der Interaktion beteiligt sein. Die Ergebnisse aus den Transaktivierungsexperimenten deuten sogar auf eine von AATF unabhängige Assoziation von ZIPK und dem Rezeptor hin. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die in Abb. 2.3.1. dargestellten ZIPK-Konstrukte zusammen mit dem Flag-Androgenrezeptor in HEK293-Zellen koexprimiert.

Neben dem Wildtyp (1) und der kinasedefizienten ZIPK-K42A (2) wurde die Deletionsmutante  $\Delta C1$  ohne Leucinzipper (3),  $\Delta C2$  bei der der C-Terminus ab Aminosäure 337 deletiert ist (4) und  $\Delta C3$  bei der die gesamte nichtkatalytische Domäne fehlt (5) eingesetzt. Bei den Letzteren (4 und 5) ist mit der Deletion auch die funktionelle Kernlokalisationssequenz (NLS) weggefallen. Daher wurde künstlich die NLS des LT-Antigens des SV40 angefügt, um die ZIPK-typische Lokalisation im Kern zu gewährleisten. Außerdem war die Mutante  $\Delta N1$  vorhanden, bei der die komplette katalytische Domäne fehlt (6).



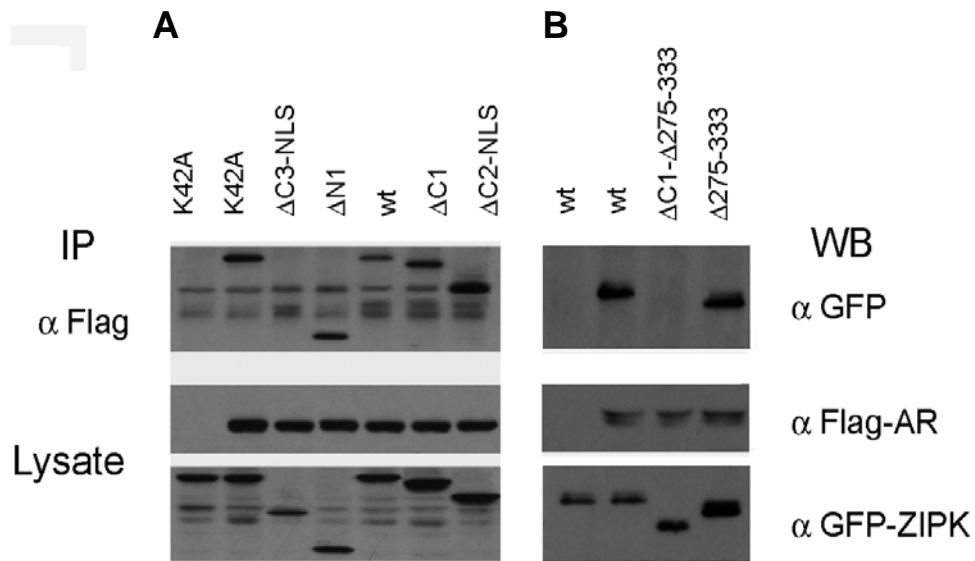
**Abb. 2.3.1.: Schematische Darstellung der verwendeten ZIPK-Deletionskonstrukte.** Alle ZIPK-Konstrukte sind N-terminal an eGFP fusioniert. Die Länge des Balkens entspricht der relativen Länge in Aminosäuren, Striche deuten deletierte Bereiche an. Der dunkelgraue Bereich der N-terminalen Hälfte zeigt die Ausdehnung der Kinasedomäne. Die hellgrauen Streifen zeigen putative Kernlokalisationsmotive an. Der dunklere Bereich am C-Terminus zeigt die Position des Leucinzippers.

Die Immunpräzipitation wurde mit anti-Flag-Antikörper durchgeführt und die Eluate im Western Blot auf kopräzipitierte GFP-ZIPK-Fusionsproteine hin untersucht. Abb. 2.3.2. A zeigt, dass die Deletionsmutante  $\Delta C3$  nicht mit dem Androgenrezeptor präzipitierte, während die Deletion der Kinasedomäne bei der  $\Delta N1$  die Interaktion nicht einschränkte. Eine deutliche Bande zeigten ebenfalls die Mutanten  $\Delta C1$  und  $\Delta C2$ . Somit konnte der minimale Bereich, mit dem die Kinase noch mit dem Rezeptor assoziiert, auf die Aminosäuren 278-337 eingegrenzt werden.

Im Rahmen seiner Diplomarbeit stellte Achmet Imam Chasan weitere ZIPK-Mutanten her, bei denen der Bereich 275-334 (Abb. 2.3.1. (7)) deletiert ist, sowie die Kombination dieser Deletion mit der  $\Delta C1$ -Deletion des Leucinzippers (8) (Imam Chasan, Diplomarbeit 2007).

In Abb. 2.3.2. B ist zu sehen, dass die Deletion des zuvor eingegrenzten Bereichs auch nicht die gemeinsame Präzipitation verhinderte. Die Kombination der Deletionen des Leucinzippers mit der Deletion der Aminosäuren 275-333 war dagegen nicht mehr interaktionsfähig, und wurde nicht mit dem Androgenrezeptor zusammen aufgereinigt.





**Abb. 2.3.2.: Die ZIPK bindet über ihren Leucinzipper und den Bereich 275-334 an den Androgenrezeptor.** HEK293-Zellen wurden kotransfiziert mit Flag-Androgenrezeptor und GFP-ZIPK-Konstrukten. Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für 60 min mit 10 nM DHT induziert. IP wurde durchgeführt mit anti-Flag-Antikörper. A: Der minimale Bereich, der noch an den Rezeptor bindet, liegt zwischen den Deletionen  $\Delta C2$  und  $\Delta C3$ . B: Zusätzlich muss der Leucinzipper deletiert werden, um die Interaktion zu unterbinden. Negativkontrollen jeweils ohne transfizierten Androgenrezeptor.

Somit konnte gezeigt werden, dass die ZIPK über zwei getrennte Bereiche an den aktivierten Androgenrezeptor assoziiert wird. Zum einen spielt der Leucinzipper eine Rolle. Hier könnte eine indirekte Interaktion über AATF im Hintergrund stehen. Zum anderen war die Kinase auch ohne Leucinzipper noch mit dem ersten Drittel der nichtkatalytischen Domäne interaktionsfähig. Die Kinasedomäne scheint hierbei keine Rolle zu spielen.

## 2.4. Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Androgenrezeptor und ZIPK

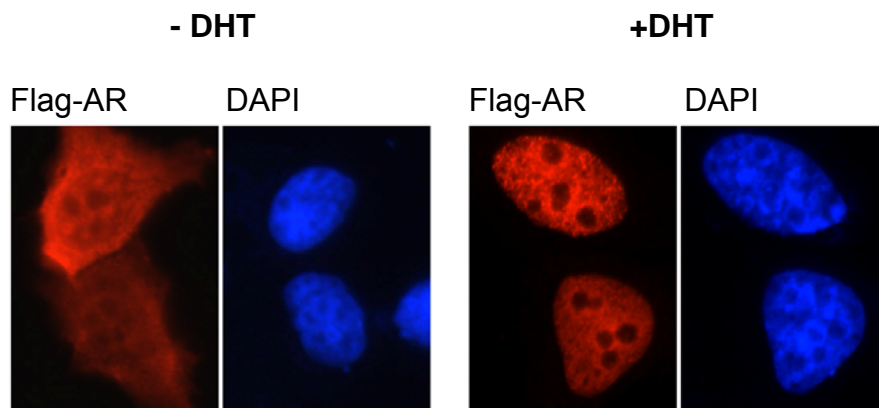
Viele Proteine die interagieren, zeigen in ihrem mikroskopischen Verteilungsbild eine ähnliche oder sogar identische Lokalisation, was im allgemeinen auch als Hinweis für eine funktionelle Beziehung der Proteine gesehen wird. Deshalb sollte in diesem Abschnitt der Androgenrezeptor auf eine mögliche Kollokalisaton mit der ZIPK hin überprüft werden.

### 2.4.1. Lokalisation der Proteine in Einzelexpression

Zunächst wurde dazu die Lokalisation von ZIPK und Androgenrezeptor in Einzelexpression untersucht. MCF7-Zellen wurden mit Flag-Androgenrezeptor oder GFP-ZIPK transfiziert und 24 h in hormonfreiem Medium gehalten. 90 Minuten vor der Fixierung wurde ein Teil der Zellen mit DHT versehen. Der Androgenrezeptor wurde mittels anti-Flag-Antikörper markiert und mit einem sekundären Cy3-gekoppelten Antikörper rotfluoreszierend angefärbt. Die Kerne wurden mittels DAPI-Farbstoff blaufluoreszierend angefärbt.

In Abb. 2.4.1. ist zu sehen, dass der Androgenrezeptor unter hormonfreien Bedingungen über die gesamte Zelle verteilt war. Geringe Mengen befanden sich zwar im Kern, aber der weitaus größere Anteil lokalisierte im cytoplasmatischen Bereich, so dass sich der Kern sogar als schwacher Schatten vom Cytoplasma abzeichnete. In Anwesenheit des Hormons war die Verteilung des Rezeptors ausschließlich auf den Zellkern begrenzt.

Der Rezeptor war nicht diffus im Kern verteilt, sondern zeigte viele unregelmäßige Bereiche mit hoher Konzentration. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Bereiche, in denen viele Androgen-„Responsepromotoren“ vorliegen, an welche die aktivierten Rezeptoren assoziieren.

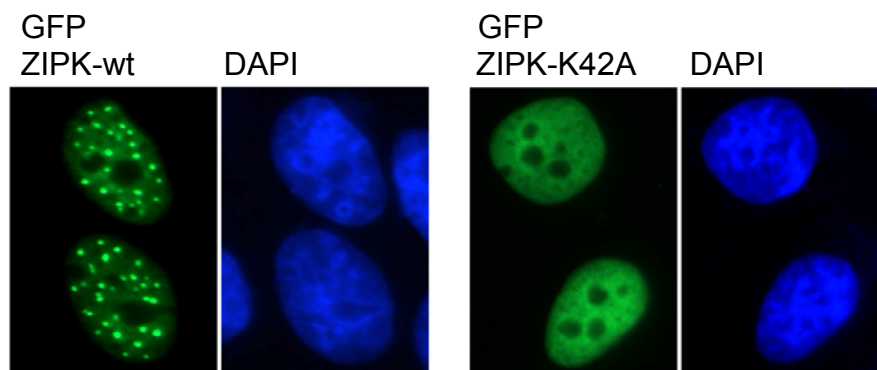


**Abb. 2.4.1.: Die zelluläre Verteilung des Androgenrezeptors.**

MCF7-Zellen wurden transfiziert mit dem Flag-Androgenrezeptor-Expressionsplasmid. Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für 90 min mit 10 nM DHT induziert. Der Androgenrezeptor wurde angefärbt mittels anti-Flag-Antikörper und Cy3-gekoppeltem sekundären Antikörper. Die Kerne wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI blau angefärbt.

Ausgespart bleiben mehrere kleine runde Areale. Hierbei handelt es sich um die Nukleoli, welche in Tumorzelllinien oft in mehrere kleine Fragmente zerfallen. Da hier pre-mRNA-Spleißen und andere Prozesse zur Entwicklung fertiger mRNAs stattfinden, wäre räumliche Nähe von aktiven Promotoren sinnvoll. Möglicherweise erscheinen daher gerade die Bereiche um die Nukleoli besonders hell gefärbt.

Weiter wurde die Lokalisation der ZIPK als GFP-Fusionsprotein untersucht. In Abb. 2.4.2 ist die ZIPK in ihrer typischen Lokalisation zu sehen. Wie schon in Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (Kögel *et al.*, 1998), war die ZIPK kernständig und in vielen kleinen Punkten, den „Speckels“ lokal konzentriert. Die inaktive Mutante K42A war im Gegensatz dazu relativ gleichmäßig über den Kern verteilt. Auch hier erschienen die Bereiche um die Nukleoli etwas heller. Im Vergleich mit dem Androgenrezeptor war dieses Phänomen allerdings weniger ausgeprägt und die Verteilung erschien diffuser. Wie beim Androgenrezeptor blieben die Nukleoli als dunkle Flecken ausgespart.



**Abb. 2.4.2.: Die Anordnung der ZIPK wt und K42A im Kern.**

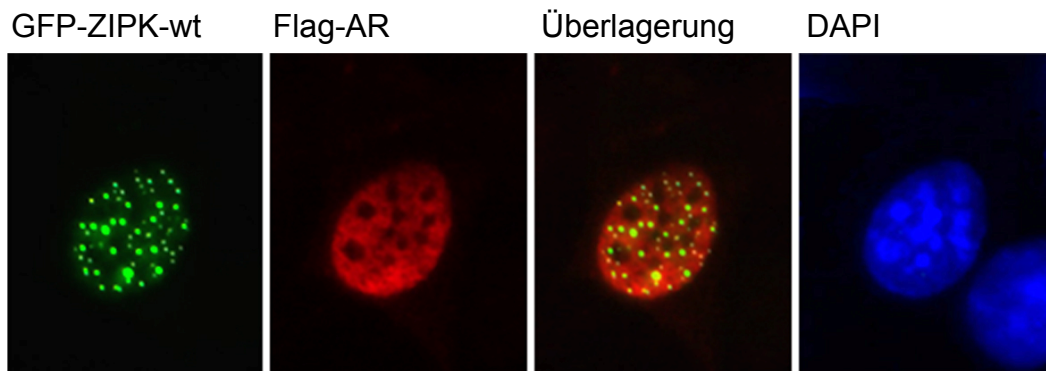
MCF7-Zellen wurden transfiziert mit eGFP-ZIPK-wt oder -K42A Expressionsplasmid. Zellen wurden 24 h nach der Transfektion fixiert. Die eGFP-markierte Kinase fluoresziert grünlich. Die Kerne wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI blau angefärbt.

## 2.4.2. Kolokalisation der ZIPK mit dem Androgenrezeptor

Darauf aufbauend wurden Flag-Androgenrezeptor und GFP-ZIPK koexprimiert, um zu untersuchen, ob sich möglicherweise überlagernde Strukturen erkennen lassen. Die Zellen wurden wie zuvor mit DHT induziert, nach 90 Minuten fixiert und angefärbt. Es zeigte sich (Abb. 2.4.3.), dass unter Verwendung der ZIPK-„Wild-Typ“ beide Proteine ihre zuvor gezeigte unterschiedliche Verteilung im Kern beibehielten. Einige der „Speckles“ der ZIPK ließen sich zwar mit Bereichen hoher Rezeptorkonzentration in Einklang bringen, es könnte jedoch bestenfalls von einer partiellen Kolokalisation gesprochen werden. Es hat nicht den Anschein, dass sich aus Kinase und Rezeptor stabile Komplexe bilden und allenfalls transiente Interaktionen eingegangen werden.

Exprimierte man dagegen den Androgenrezeptor mit der inaktiven Kinase K42A, ließ sich eine interessante Beobachtung machen: In Abb. 2.4.4. sind zwei typische Exemplare doppeltransfizierter Zellen zu sehen. Man kann erkennen, dass hier die GFP-ZIPK-K42A

nicht wie zuvor diffus, sondern unregelmäßig im Kern angeordnet war und dass sich deutliche Anhäufungen gebildet hatten, während andere Bereiche dunkler blieben.



**Abb. 2.4.3.: Die zelluläre Verteilung der ZIPK-wt in Koexpression mit dem Androgenrezeptor.**

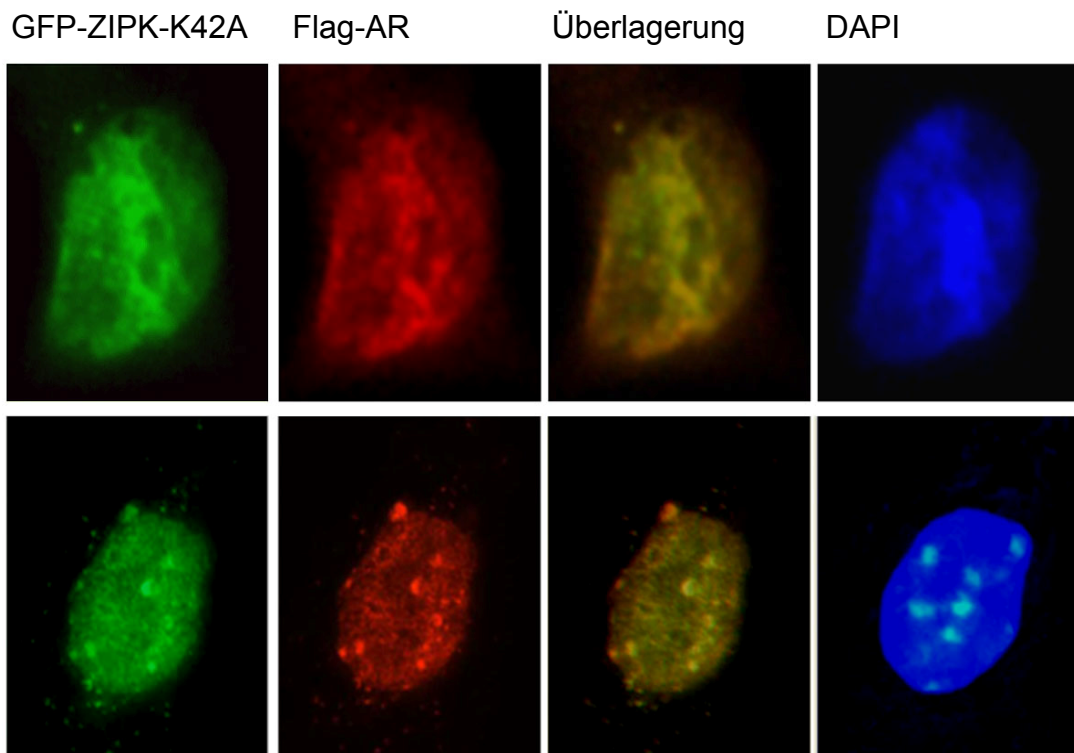
MCF7-Zellen wurden transfiziert mit GFP-ZIPK-wt und Flag-Androgenrezeptor. Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für 90 min mit 10 nM DHT induziert. Der Androgenrezeptor wurde mittels anti-Flag-Antikörper und Cy-3-gekoppeltem sekundären Antikörper angefärbt. Die GFP-markierte Kinase fluoresziert grünlich. Die Kerne wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI blau angefärbt.

Beim Vergleich mit dem Androgenrezeptor (in rot) wurde deutlich, dass die Anordnung der beiden Proteine sehr ähnlich ist, und in der Überlagerung war zu sehen, dass die Fluoreszenzsignale von ZIPK und dem Androgenrezeptor fast identisch waren. Aus den roten und den grünen Fluoreszenzsignalen entstanden viele gelbe Areale. Dies ist eine eindeutige Kolokalisation, bei der die sonst eher diffus angeordnete Kinase offenbar nun der Lokalisation des Rezeptors unterworfen wurde. Ein weiterer Hinweis, dass es offenbar einen funktionellen Zusammenhang geben muss.

Während der Wild-Typ nur an wenigen Stellen mit dem Rezeptor kolokalisierte, schien die inaktive Kinase die transiente Komplexbildung zu stabilisieren. Möglicherweise behindert das Ausbleiben einer notwendigen Phosphorylierung die Dynamik des Komplexes so, dass sich stabile Komplexe aus Rezeptoren und inaktiver Kinase anhäufen und so als leuchtende Strukturen im Kern mikroskopierbar werden.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen der zuvor beschriebenen Koimmunpräzipitationen. Auch dort konnte gezeigt werden, dass die inaktive Mutante der ZIPK eine stabilere Interaktion mit dem Androgenrezeptor eingeht.

Ebenfalls fällt auf, dass die Lokalisation der beiden Proteine in Bezug auf die Nukleoli weniger ausgeprägt erscheint als zuvor. Während sich die Nukleoli in den vorherigen Aufnahmen als runde Schatten abzeichneten, nahmen Rezeptor und Kinase hier offenbar nicht die gehabte Position gegenüber diesen Kernstrukturen ein. Dieses Phänomen ist ein Indiz dafür, dass die inaktive Kinase auch den Androgenrezeptor in seiner natürlichen Lokalisation stört.

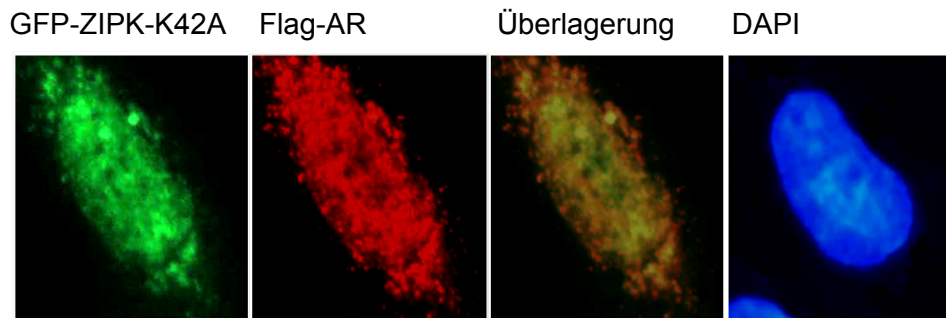


**Abb. 2.4.4.: Kolokalisation der GFP-ZIPK-K42A mit dem Androgenrezeptor.**

MCF7-Zellen wurden transfiziert mit GFP-ZIPK-K42A und Flag-Androgenrezeptor. Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für 90 min mit 10 nM DHT induziert und fixiert. Der Androgenrezeptor wurde angefärbt mittels anti-Flag-Antikörper und Cy3-gekoppeltem sekundären Antikörper. Die GFP-markierte Kinase fluoresziert grünlich. Die Kerne wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI blau angefärbt.

Bei extrem starker ektopischer Expression entstehen große, teils cytoplasmatisch lokalisierte Proteinaggregate. Bei der Transfektion der Zellen mit gängigen Transfektionsreagenzien ist die Menge an Plasmiden, die in eine Zelle aufgenommen werden unterschiedlich. So entstehen auch Zellen mit extremen Mengen der exogenen Proteine. Hierbei ist zwar eine deutliche Kolokalisation über die gesamte Zelle zu sehen, die zelluläre Verteilung ist aber wahrscheinlich ein Artefakt, welches auf unnatürlich hohe Proteinmengen (Abb. 2.4.5.) zurückzuführen ist. Möglicherweise können die Zellen nur begrenzte Proteinmengen in den Kern aufnehmen, oder es gibt eine Möglichkeit nicht funktionale Initiationskomplexe aus dem Kern heraus ins Cytoplasma zu transportieren um sie dort abzulagern.

Zusammengefasst konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass die partielle Kolokalisation der Kinase mit dem Rezeptor durch die inaktive ZIPK-Mutante deutlich verstärkt wurde.

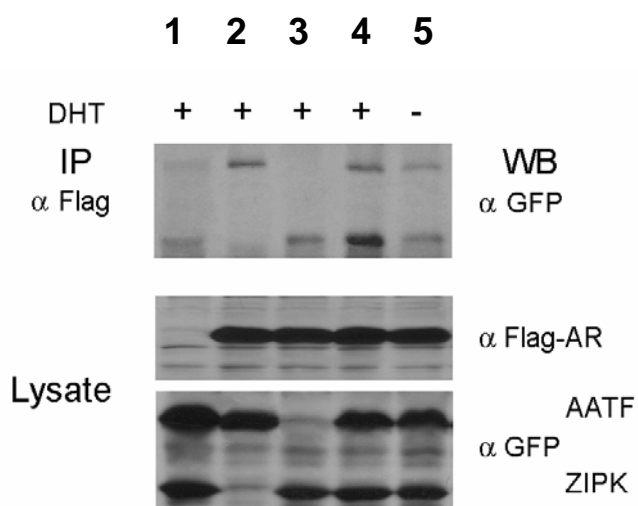


**Abb. 2.4.5.: Kolokalisation der GFP-ZIPK-K42A mit dem Androgenrezeptor.**

MCF7-Zellen wurden transfiziert mit GFP-ZIPK-K42A und Flag-Androgenrezeptor. Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für 90 min mit 10 nM DHT induziert. Der Androgenrezeptor wurde mittels anti-Flag-Antikörper und Cy-3-gekoppeltem sekundären Antikörper angefärbt. Die GFP-markierte Kinase fluoresziert grünlich. Die Kerne wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI blau angefärbt.

## 2.5. AATF stabilisiert die Interaktion von ZIPK und Androgenrezeptor

Im Abschnitt 2.1. wurde gezeigt, dass AATF und ZIPK in der Koaktivierung androgenabhängiger Reporterkonstrukte kooperieren. Zusätzlich wurde in Abschnitt 2.3. gezeigt, dass der Leucizipper der Kinase, welcher als Interaktionsdomäne für AATF kartiert ist, auch eine Rolle in der Interaktion mit dem Rezeptor spielt. Es stellt sich folglich die Frage, ob sich AATF und die ZIPK in ihrer Assoziation an den aktivierten Androgenrezeptor beeinflussen. Dazu wurde zum einen Flag-Androgenrezeptor, sowie GFP-AATF und GFP-ZIPK in verschiedenen Kombinationen in HEK293-Zellen transfiziert und eine Immunpräzipitation mit dem anti-Flag-Antikörper durchgeführt. Im Western Blot wurden dann kopräzipitierte GFP-Fusionsproteine detektiert (Abb 2.5.1.).



**Abb. 2.5.1.: ZIPK und AATF lassen sich gemeinsam mit dem Rezeptor präzipitieren.** HEK293-Zellen wurden wie angegeben transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Induktion mit 10 nM DHT für 90 min. Die Zellen wurden geerntet und Gesamtextrakte hergestellt. Die IP wurde mit dem anti-Flag-Antikörper durchgeführt. Im obersten Bild sind die mitgereinigten GFP-Fusionsproteine zu sehen. Im oberen Bereich das etwas größere GFP-AATF, darunter GFP-ZIPK.

Hier ist erstmals zu sehen, dass auch AATF mit dem aktivierten Androgenrezeptor kopräzipitiert. Dies ist eine Erweiterung des Befundes, dass AATF und der Rezeptor *in vitro* interagieren (Leister *et al*, 2003). Während in der ersten Spur ohne Flag-Androgenrezeptor nur eine schwache Spur von GFP-AATF zu erahnen war, zeigte sich in der zweiten Spur mit dem Rezeptor eine deutliche Bande. Etwa in gleicher Stärke wurde auch die GFP-ZIPK in Spur 3 mit aufgereinigt. Interessanterweise wurde die mit dem Androgenrezeptor gereinigte ZIPK-Bande in Anwesenheit von zusätzlich exprimiertem AATF noch um das vier- bis fünffache stärker (Spur 4). Die Anwesenheit von AATF begünstigte also offenbar die Stabilität der Interaktion zwischen Androgenrezeptor und der ZIPK. Möglicherweise interagieren sowohl AATF als auch die ZIPK in einem trimeren Komplex mit dem Rezeptor. Es wäre auch denkbar, dass AATF als Anker für die Kinase an den Transkriptionskomplex dient. Da AATF und ZIPK beide vom anti-GFP-Antikörper detektiert wurden, lässt sich abschätzen, dass von der ZIPK etwa die dreifache Menge Moleküle gebunden wurden als von AATF. Es konnten also in Kombination mit AATF mehr ZIPK-Proteine mit dem Rezeptor assoziieren.

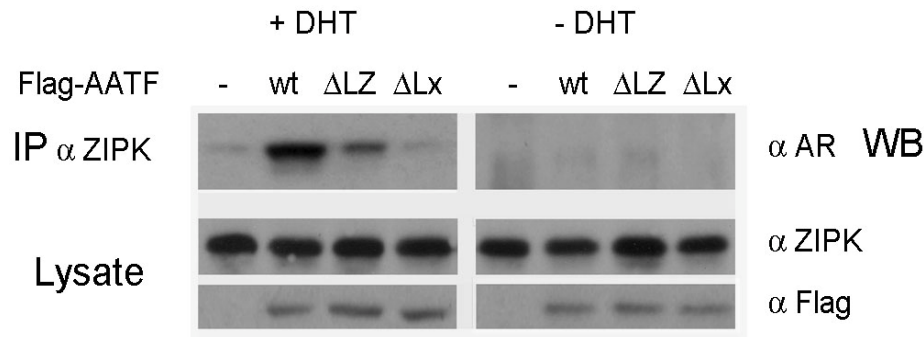
Im Grundzustand, ohne Hormon (Spur 5) erschienen die Banden beider Proteine deutlich schwächer und in fast gleicher Stärke. Dadurch wirkte die Hormonabhängigkeit der Bindung des Rezeptors mit der ZIPK (Spur 4) deutlicher als beim darüberliegenden AATF. Aber auch für AATF zeigt eine gewisse Hormonabhängigkeit *in vivo*, während im *in vitro* Experiment die Interaktion von AATF mit dem Androgenrezeptor nicht hormonabhängig war (Leister *et al*, 2003).

Darauf aufbauend wurde untersucht, wie sich die Inaktivierung des Leucinzippers oder der Lx-Motive von AATF auf die Interaktion von ZIPK mit dem Rezeptor auswirkten. Die AATF-Konstrukte  $\Delta$ Lx und  $\Delta$ LZ sowie der „Wild-Typ“ wurden in HEK293-Zellen transfiziert. Mit den Extrakten wurde eine Immunpräzipitation mit anti-ZIPK-Antikörper durchgeführt und der mitgereinigte endogene Androgenrezeptor im Western Blot nachgewiesen. Das Experiment wurde in Doppelansätzen ausgeführt, von denen jeweils eine Probe mit DHT induziert wurde (Abb. 2.5.2.).

Während ohne ektopisch exprimiertes AATF in der ersten Spur die Bande des Androgenrezeptors nur zu erahnen war, wurde in Anwesenheit von zusätzlich exprimiertem AATF (zweite Spur) eine sehr deutliche Bande kopräzipitiert. In der dritten Spur wird die Bedeutung des Leucinzippers deutlich. Die Menge des mit der ZIPK gereinigten Rezeptors nimmt deutlich ab, wenn die AATF-Variante mit mutiertem Leucinzipper exprimiert wurde. Wurde dagegen das dreifach mutierte AATF Konstrukt  $\Delta$ Lx verwendet (Spur 4), ließ sich wiederum nur eine sehr schwache Bande erahnen.



In den Proben ohne Hormon (Abb. 2.5.2. rechts), lag die Menge des mitgereinigten Androgenrezeptors erwartungsgemäß unter der Nachweisgrenze. Dies unterstützt wiederum die Annahme der Hormonabhängigkeit der Interaktion.



**Abb. 2.5.2.: Der Leucinzipper und die Lx-Motive von AATF vermitteln zwischen ZIPK und dem Rezeptor.** HEK293-Zellen wurden wie angegeben mit Flag-AATF-Konstrukten transfiziert. Bei der Mutante  $\Delta$ LZ ist der Leucinzipper mittels doppelter Punktmutation inaktiviert, bei der Mutante  $\Delta$ Lx sind zusätzlich noch das N- und C-terminale Lx-Motiv zerstört. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Induktion mit 10 nM DHT für 90 min. Die Zellen wurden geerntet und Gesamtextrakte hergestellt. Die IP wurde mit anti-ZIPK-Antikörper durchgeführt. In den obersten Ausschnitten ist der mit aufgereinigte Androgenrezeptor zu sehen.

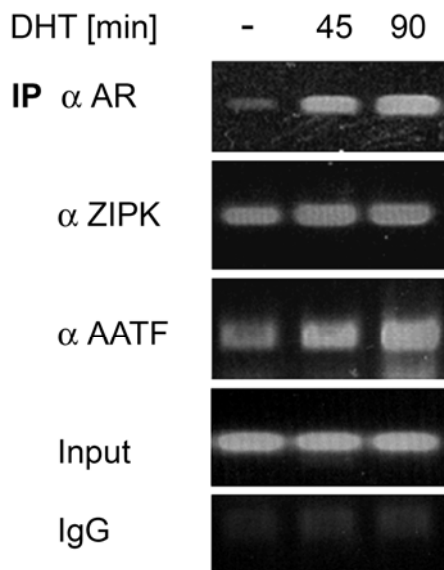
Somit konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass im Einklang mit den Daten aus der Transaktivierung AATF und ZIPK auch in ihrer Bindung an den hormonebundenen Rezeptor kooperieren. Die Interaktion von AATF mit dem Rezeptor über seine Lx-Motive spielt hierbei eine tragende Rolle. Auch die Interaktion zwischen AATF und ZIPK über ihre jeweiligen Leucinzipper ist für die Bildung des Komplexes von Bedeutung. Zu beachten ist, dass bei der Dreifachmutante AATF- $\Delta$ LX auch die Leucinzippermutation trägt. Dieses Ergebnis passt zu den Daten aus den Transaktivierungsexperimenten, auch hier hat die Mutation der Lx-Motive von AATF einen größeren Einfluss als die Deletion des Leucinzippers. Auch die Ergebnisse der Kartierung, Abschnitt 2.3., wo gezeigt wurde, dass der Leucinzipper der ZIPK und der Bereich 275-333 unabhängig genutzt werden können, um die Bindung der Kinase zu vermitteln stehen im Einklang mit diesem Ergebnis.

## 2.6. AATF und ZIPK sind an androgenabhängigen Promotoren nachweisbar

Die gesammelten Daten legen nahe, dass AATF und die ZIPK als kooperative Koaktivatoren des Androgenrezeptors fungieren. Daraus resultiert die Frage, mit welchem Mechanismus



die Kinase die androgenabhängige Transkription beeinflusst. Von der Hormonbindung durch den Steroidrezeptor bis hin zur fertigen mRNA gibt es viele denkbare Möglichkeiten, wie eine Kinase die Effektivität der Transkription unterstützen kann. Die in dieser Arbeit gezeigte Dynamik und Zeitabfolge ihrer Interaktion mit dem Androgenrezeptor lassen jedoch vermuten, dass die Kinase vor allem in frühen Abläufen der Transkriptionsinitiation beteiligt ist. Folglich sollte die ZIPK, aber auch AATF, in Assoziation mit aktiven androgenabhängigen Promotoren nachweisbar sein.



**Abb. 2.6.1.: Chromatin-IP zeigt hormonabhängige Bindung von ZIPK und AATF an den PSA-Promotor.** LNCaP-Zellen wurden nach 48 h in hormonfreiem Medium wie angegeben mit 10 nM DHT induziert. Aus den fixierten Extrakten wurde mit den angegebenen Antikörpern die Chromatin-IP durchgeführt. Die Abbildungen zeigen das Produkt der semiquantitativen PCR aufgetrennt im Agarosegel. Die IP gegen den AR dient als Positivkontrolle, „Input“ zeigt, dass gleichmäßige Chromatinmengen zum Einsatz kamen und die Proben mit unspezifischen Antikörpern (IgG) dienen als Negativkontrollen für Spezifität.

Mittels Chromatin-Immunpräzipitation lässt sich ermitteln, ob ZIPK und AATF nach hormoneller Induktion unmittelbar oder als Element eines größeren Komplexes an den aktiven Promotor gebunden vorliegen. Dafür wurden zunächst LNCaP-Zellen für 48 Stunden in hormonfreiem Medium kultiviert. Die Zellen wurden nach kurzer Hormoninduktion mittels PFA fixiert, so dass DNA-gebundene Proteine und Komplexe kovalent mit der DNA vernetzt werden. Das Chromatin wurde mittels Ultraschall in kleine Fragmente zerlegt. Aus diesen Extrakten wurde eine Immunpräzipitation mit spezifischen anti-ZIPK- und anti-AATF-Antikörpern durchgeführt. Anschliessend wurden die kovalenten Vernetzungen durch Hitzezufuhr gelöst, und die mitgereinigten DNA-Fragmente mittels semiquantitativer PCR auf den PSA-Promotor und Enhancerbereiche untersucht.

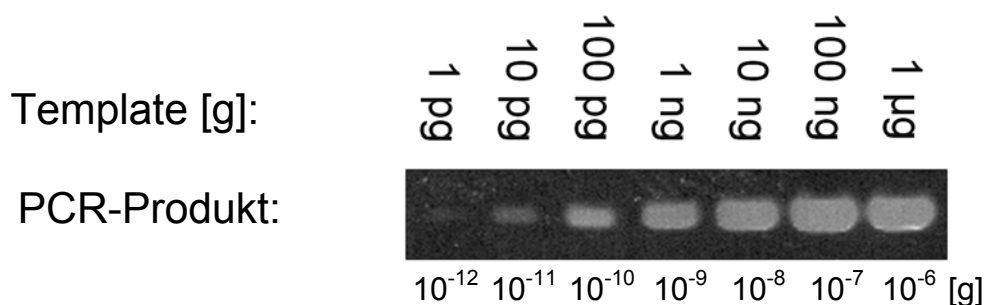
In Abb. 2.6.1. sind die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese nach semiquantitativer PCR abgebildet. Die Stärke der jeweiligen PCR-Produkt-Bande lässt relative Rückschlüsse darauf zu, wie viel genomische Promotor-DNA unter den jeweiligen Bedingungen an die Proteine gebunden vorlag und so in der Immunpräzipitation mitgereinigt wurde.

In der ersten Zeile der Abbildung ist die Positivkontrolle abgebildet. Hier wurde die Immunpräzipitation mit anti-Androgenrezeptor-Antikörper durchgeführt, und es wurde

deutlich, dass ohne hormonelle Induktion nur eine sehr geringe Menge am PSA-Promotor-DNA mitpräzipitiert wurde. Dagegen war die PCR-Bande nach 45 Minuten Behandlung mit DHT um ein mehrfaches stärker, was bedeutet, dass schon nach 45 Minuten viele Rezeptormoleküle an das „Androgen-Response-Element“ des PSA-Promotors angedockt hatten. Am stärksten erschien die Bande nach 90 Minuten Induktion, woran man erkennt, dass die Bindung der Rezeptoren an die Promotoren der Zellpopulation weiter ansteigt. In der zweiten Zeile wurde mit spezifischem Antikörper gegen die ZIPK die Immunpräzipitation durchgeführt. In der ersten Spur (ohne Hormon) erschien eine Bande, jedoch war sie auch hier die schwächste. Daher waren die Unterschiede zu den Proben 45 und 90 Minuten DHT-Induktion etwas geringer und zeigten eine weniger ausgeprägte Hormonabhängigkeit. Da die ZIPK generell ein kernständiges Protein ist wäre es möglich, dass auch ohne Hormon geringe Mengen der Kinase zufällig in proximale Nähe des Promotors kommen und so mit fixiert wurden. Im Vergleich mit der untersten Zeile, in der die Immunpräzipitationen mit unspezifischen IgG eine Negativkontrolle durchgeführt wurden, wurde auch deutlich, dass es sich hierbei um eine ZIPK-spezifische Anreicherung von Promotor-DNA handelt. Dass aber auch geringe Mengen Androgenrezeptor in dieser Probe an den Promotor gebunden waren, könnte auch als Hinweis auf Spuren von hormonell wirkenden Substanzen (z.B. Weichmacher aus den Plastikgefäßen) im Medium sein.

In der dritten Zeile wurde das Experiment mit anti-AATF-Antikörper durchgeführt, und obwohl auch hier ohne Hormon eine deutliche Bande zusehen war, war der Zuwachs an mitgereinigter Promotor-DNA schon nach 45 Minuten deutlich stärker als bei der ZIPK. Wie beim Androgenrezeptor kam es nach 90 Minuten Induktion noch einmal zu einer deutlichen Zunahme der Bandenstärke.

Darunter ist die Ladekontrolle („Input“), bei der aus jedem Lysat eine Probe genommen wurde, um zu zeigen, dass jeweils die gleiche Menge fragmentiertes Chromatin eingesetzt wurde.



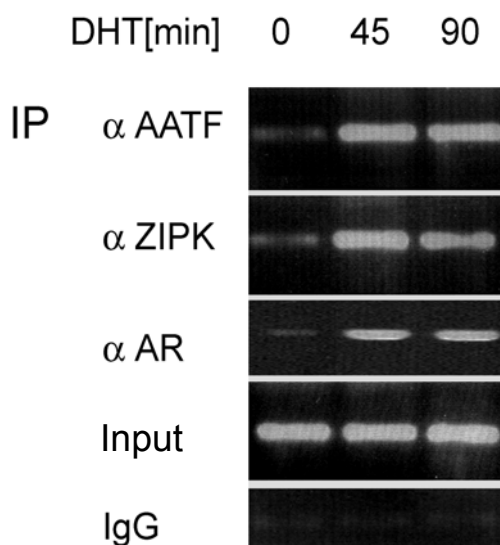
**Abb. 2.6.2.: Testreihe für die semiquantitative PCR.** Genomische DNA aus LNCaP-Zellen wurde, wie für Chromatin-IP üblich, fixiert, lysiert und aufgereinigt. Davon wurden in acht Schritten zu jeweils 1/10, eine Verdünnungsreihe angefertigt und unter den standardisierten Bedingungen für die Chromatin-IP eine PCR mit 35 Zyklen durchgeführt.

Anhand der Bandenstärke lässt sich jedoch lediglich eine relative Aussage über die mitgereinigte DNA-Menge anstellen. Um eine ungefähre Vorstellung von den Relationen der Bandenstärke zur eingesetzten Template-Menge zu erlangen, wurde eine Verdünnungsreihe mit fragmentiertem und gereinigtem Chromatin durchgeführt (Abb. 2.6.2.).

An den Bandenstärken der PCR-Produkte wurde deutlich, dass schon geringe Unterschiede in der Bandenstärke auf einem vielfachen Unterschied in der eingesetzten Template-Menge beruhen. Außerdem zeigt diese Reihe, dass die „semiquantitative“ PCR in einem weiten Bereiche auch kleine Unterschiede der Templatmenge abbilden kann.

### 2.6.1. ZIPK und AATF erscheinen hormonabhängig auch am Enhancer des PSA-Promotors

Über die Abläufe am PSA-Promotor nach hormoneller Induktion gibt es diverse Veröffentlichungen. Es konnte gezeigt werden, dass sich der etwa vier Kilobasen vor dem Transkriptionsstartpunkt gelegene Enhancer bei Hormonzugabe in einer großen Schleife an den Promotor anlagert, und so Enhancer und Promotor, die etwa vier Kilobasen voneinander entfernt liegen, in einem großen Transkriptionsinitiationskomplex verbunden werden (Shang *et al*, 2002). Daher wurden die Eluate der Chromatin-Immunpräzipitationen zusätzlich mittels spezifischer Primer auch auf möglicherweise vorhandene PSA-Enhancerelemente hin untersucht (Abb. 2.6.3.).



**Abb. 2.6.3.: Chromatin-IP zeigt hormonabhängige Bindung von ZIPK und AATF an den PSA-Enhancer.** LNCaP-Zellen wurden nach 48 h in hormonfreiem Medium wie angegeben mit 10 nM DHT induziert. Aus den fixierten Extrakten wurde mit den angegebenen Antikörpern die Chromatin-IP durchgeführt. Die Abbildungen zeigen das Produkt der semiquantitativen PCR aufgetrennt im Agarosegel. Die IP gegen den AR dient als Positivkontrolle, „Input“ zeigt, dass gleichmäßige Chromatinmengen zum Einsatz kamen und die Proben mit unspezifischen IgG dienen als Negativkontrollen.

Auch hier kann man deutlich erkennen, dass AATF schon nach 45 Minuten an den PSA-Enhancer gebunden war. In diesem Fall stieg die Menge der gebundenen DNA bis zum Zeitpunkt von 90 min nicht weiter an. Die ZIPK zeigte ebenfalls eine deutliche Assoziation an den Enhancer nach 45 Minuten. Im Vergleich zum vorherigen Experiment zeigt sich, dass die Hormonabhängigkeit der Bindung am Enhancer stärker ausgeprägt war als am Promotor. Interessant ist auch, dass nur bei der ZIPK nach 90 Minuten schon ein leichter Rückgang der mitgereinigten Enhancer-DNA zu verzeichnen war. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten der Interaktionszeitreihe in Abschnitt 2.2.2., denn auch dort konnte schon nach 90 Minuten ein leichter Rückgang des kopräzipitierten Rezeptors festgestellt werden.

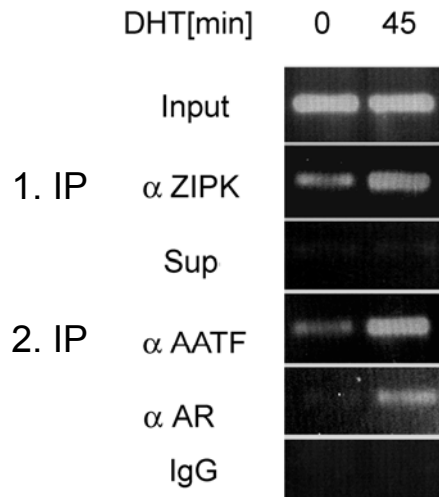
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass AATF und die ZIPK sowohl am Promotor- als auch am Enhancerbereich des aktiven PSA-Promotors gebunden sind. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine Funktion von AATF und der ZIPK in der androgenstimulierten Transkriptionsinitiation.

### **2.6.2. AATF und ZIPK bilden einen gemeinsamen Komplex mit dem AR am aktiven PSA-Promotor**

Offen blieb die Frage, ob AATF und ZIPK gemeinsam an den Transkriptionsinitiationskomplex binden oder unabhängig voneinander möglicherweise in verschiedenen Komplexen vorkommen. Zwar konnte mit der Koimmunpräzipitation (Abschnitt: 2.5.) gezeigt werden, dass AATF die Bindung der Kinase begünstigt, der Nachweis, ob sie beide im gleichen Protein-DNA-Komplex vorliegen, steht jedoch noch aus.

Hierzu wurde zunächst wie in den vorherigen Abschnitten eine Chromatin-Immunpräzipitation mit anti-ZIPK-Antikörper durchgeführt, wobei hier mit der vierfachen Menge an Chromatin und Antikörper gearbeitet wurde. Nach dem Waschen der Präzipitate wurde nur ein Viertel zur Elution und Analyse in der semiquantitativen PCR genutzt. Abb. 2.6.4. zeigt in den oberen beiden Ausschnitten die hormonabhängige Bindung der Kinase an den Enhancerbereich des PSA-Promotors.

Bei den restlichen drei Vierteln der Immunpräzipitation wurden die Chromatinfragmente mittels DTT und sanftem Erhitzen von den immobilisierten Antikörpern gelöst und im Verhältnis 1/50 verdünnt. Mit diesem Eluat wurde eine erneute Immunpräzipitation durchgeführt, bei der Antikörper gegen den Androgenrezeptor und gegen AATF eingesetzt wurden.



**Abb. 2.6.4.: „ReChromatin-IP“ zeigt die hormonabhängige Entstehung eines Komplexes aus ZIPK, AATF und AR am PSA-Enhancer.** LNCaP-Zellen wurden nach 48 h in hormonfreiem Medium wie angegeben mit 10 nM DHT induziert. Aus den fixierten Extrakten wurde mit anti-ZIPK-Antikörper die erste Chromatin-IP durchgeführt. Die gereinigten DNA-Proteinkomplexe wurden eluiert und eine zweite IP mit anti-AATF- oder anti-AR-Antikörper durchgeführt. Die Proben mit unspezifischen IgG dienen als Negativkontrollen.

In den unteren drei Ausschnitten sieht man zunächst, dass AATF im selben Maße hormonabhängig in den DNA-gebundenen Proteinkomplexen vorhanden war wie die ZIPK in der ersten Präzipitation. Auch in der Aufreinigung mit anti-Androgenrezeptor-Antikörper ist in der induzierten Probe eine Bande zu sehen. Dagegen entstand aus dem Eluat der unspezifischen Antikörper (IgG) kein PCR-Produkt.

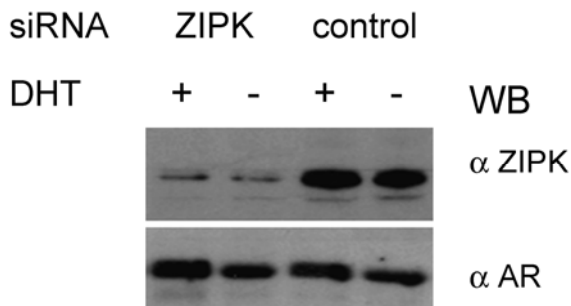
Da es sich hierbei ausschließlich um Protein-DNA-Komplexe handelte, die zuvor mit ZIPK spezifischem Antikörper aufgereinigt wurden, ist somit gezeigt, dass die ZIPK sowohl mit AATF als auch mit dem Androgenrezeptor an ein und demselben DNA-Fragment im Komplex vorlag. Ob es sich hierbei um einen trimeren Proteinkomplex handelt ist damit zwar nicht gezeigt, denn es könnten auch verschiedene Komplexe entlang von bis zu zwei Kilobasen großen DNA-Fragmenten vorliegen. Aber unter Berücksichtigung der Daten aus den Koimmunpräzipitationen ist ein gemeinsamer Proteinverband sehr nahe liegend.

## 2.7. Die ZIPK spielt eine essentielle Rolle in der Aktivierung androgenabhängiger Promotoren

Nachdem festgestellt werden konnte, dass die ZIPK als Koaktivator in der Transkriptionsinitiation androgenabhängiger Gene fungiert, ergibt sich die Frage, wie wichtig die Kinase für die Effektivität der Transkription ist.

Die heute gängigste Methode zur Repression endogener Proteine ist die RNA-Interferenz-Technik. Mittels Transfektion kleiner sequenzspezifischer RNA-Oligomere (siRNA) wird die zelleigene „Fremd-RNA-Abwehr“ auf ein bestimmtes endogenes mRNA-Transkript gelenkt und so die Expression des Proteins unterbunden.

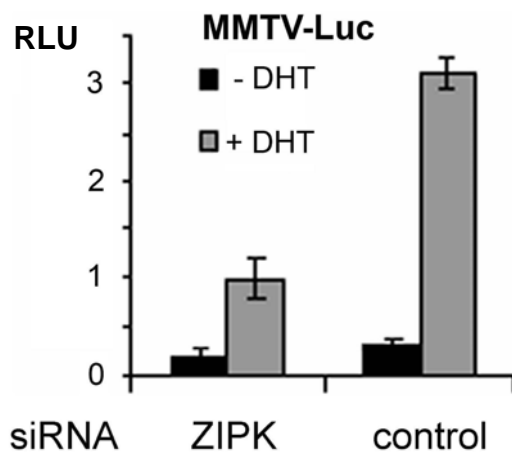
Dazu wurden zunächst HEK293-Zellen mit ZIPK-spezifischer siRNA oder unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert und die resultierende Repression im Western Blot untersucht (Abb. 2.7.1.).



**Abb. 2.7.1.: siRNA-Reduktion der ZIPK-Expression.** HEK293-Zellen wurden transfiziert mit siRNA gegen die ZIPK oder unspezifischer siRNA (control). Die Zellen wurden nach 48 h geerntet und die Extrakte im Western Blot auf ZIPK-Expression untersucht. Der Blot gegen AR diente als Mengenabgleich. Zellen wurden für 24 h mit 10 nM DHT induziert.

Es ist zu erkennen, dass das Proteinlevel der ZIPK nach siRNA-Transfektion an die Nachweisgrenze gesunken war, während in den Proben, die mit unspezifischer RNA transfiziert wurden, eine deutliche Bande detektiert wurde. Geschätzt lag die Repression bei 90 bis 95 %. Der Film musste hierbei sehr lange belichtet werden, um überhaupt noch ein Signal der ZIPK zu detektieren, was für eine sehr effektive Repression spricht. Es zeigte sich außerdem, dass die Induktion der Zellen mit DHT keinen Einfluss auf die Effektivität der siRNA Repression der Kinase hatte.

Im unteren Ausschnitt der Abbildung ist der Androgenrezeptor zu sehen, dessen Expression nicht durch die siRNA-Transfektion beeinträchtigt wird. Die Androgenrezeptorbanden erscheinen in den Proben mit Hormon im Kulturmedium geringfügig stärker, was daran liegen könnte, dass auch der Promotor des Rezeptors selber ein „Androgen Response Element“ besitzt.



**Abb. 2.7.2.: siRNA-Reduktion der ZIPK-Expression bewirkt eine geringere Promotoraktivität.**

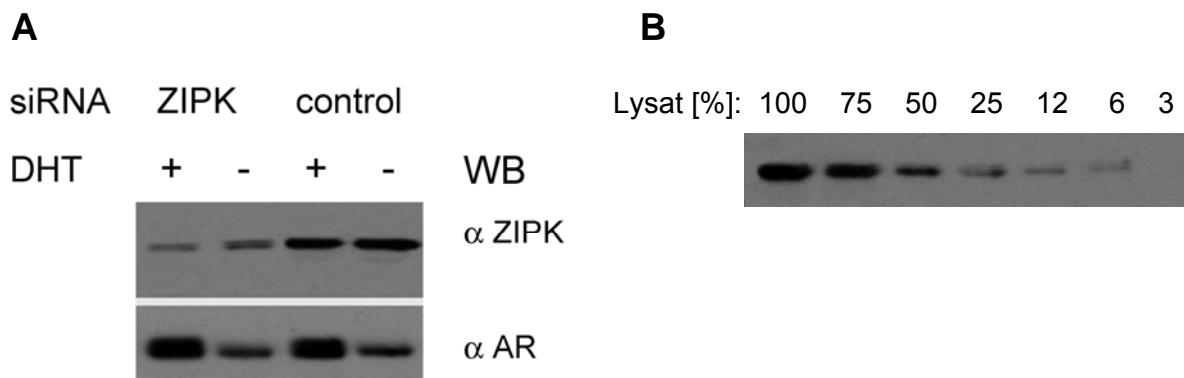
HEK293-Zellen wurden mit siRNA gegen ZIPK, dem MMTV-Luciferasereporter und dem AR kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mit 10 nM DHT induziert und die Lysate auf ihre Luciferaseaktivität gemessen.

Um gleichzeitig auch den Einfluss der Repression der Kinase auf die Promotoraktivität messen zu können, wurden die Zellen mit ZIPK-spezifischer siRNA sowie dem bekannten MMTV-Luciferase-Reporterkonstrukt und dem Expressionsplasmid für den Androgenrezeptor kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mit hormonfreiem Medium oder Medium mit 10 nM DHT kultiviert. Anschließend wurden die Zellextrakte auf ihren Luciferasegehalt gemessen.

Abb. 2.7.2. zeigt, dass die Promotoraktivität des androgeninduzierten MMTV-Promotors, nach dem Ausschalten der ZIPK-Expression durch die siRNA, um etwa zwei Drittel abnahm. Dies ist ein deutliches Anzeichen dafür, dass der Kinase in der Transkriptionsinitiation eine wichtige Funktion zukommt.

In gleicher Weise wurde auch mit LNCaP-Zellen die siRNA-Transfektion durchgeführt, da diese als hormonabhängige Prostatakarzinomzellen in Hinsicht auf die Aktivität des Androgenrezeptors besonders interessant sind. In der Abb. 2.7.3. A ist zu sehen, dass die Repression der ZIPK auch hier erfolgreich durchgeführt wurde.

Es zeigt sich im Vergleich mit den Ergebnissen aus den HEK293-Zellen jedoch, dass hier die Repression nicht ganz so effektiv war. LNCaP-Zellen verfügen aber über eine relativ hohe endogene ZIPK-Expression, weshalb der Film in diesem Fall nur relativ kurz belichtet wurde. Im unteren Teil der Abbildung ist wiederum die Expression des Androgenrezeptors als Abgleich gezeigt, der nicht durch die siRNA beeinträchtigt wird. Lediglich die Induktion mit DHT bewirkt eine deutliche Verstärkung der Rezeptorexpression durch Autoinduktion.

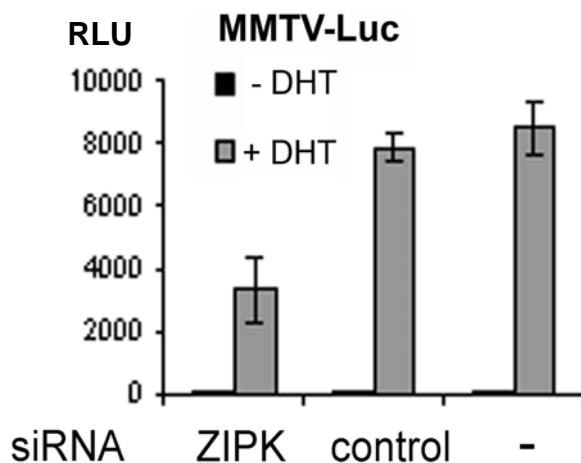


**Abb. 2.7.3. A: siRNA Reduktion der ZIPK-Expression.** LNCaP-Zellen wurden transfiziert mit siRNA gegen die ZIPK oder unspezifischer siRNA (control). Die Zellen wurden nach 48 h geerntet und die Extrakte im Western Blot auf ZIPK-Expression untersucht. Der Blot gegen AR diente als Mengenabgleich. Zellen wurden für 24 h mit 10 nM DHT induziert. **B.: Verdünnungsreihe zur Mengenabschätzung.** Eine Probe des Zelllysates ohne RNAi-Reduktion wurde wie angezeigt definiert mit Probenpuffer verdünnt und im Western Blot auf ZIPK-Bandenstärke untersucht.

Da die Bandenstärken im Western Blot in der Regel nicht linear zur vorliegenden Proteinmenge sind, wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt, um abschätzen zu können, wie stark die Repression im Verhältnis zur Kontrolle tatsächlich war.

Anhand der Bandenstärken der Verdünnungsreihe Abb. 2.7.3. B. lässt sich im Vergleich mit der Abbildung A. feststellen, dass die ZIPK-Proteinmenge in den LNCaP-Zellen auf etwa 30 % reduziert wurde.

Mittels Kofransfektion von siRNA mit dem MMTV-Luciferasereporter wurde auch in LNCaP-Zellen die resultierende Promotoraktivität gemessen. Das Diagramm in Abb. 2.7.4. zeigt, dass die Repression der ZIPK auch in dieser Zelllinie die androgenabhängige Transkriptionsrate reduzierte. Während die Luciferaseaktivität ohne siRNA-Transfektion und mit der unspezifischen Kontroll-siRNA etwa auf dem gleichen Niveau blieb, sank sie auch in diesen Zellen durch die Transfektion der ZIPK-spezifischen siRNA auf knapp 50 % ab.



**Abb. 2.7.4.: siRNA-Reduktion der ZIPK-Expression bewirkt auch in LNCaP-Zellen eine geringere Promotoraktivität.**

LNCaP-Zellen wurden mit siRNA gegen ZIPK und dem MMTV-Luciferasereporter kofransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mit 10 nM DHT induziert und die Lysate auf Luciferaseaktivität gemessen.

Zusätzlich ist eine Negativkontrolle ohne siRNA-Transfektion angefertigt worden.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass der ZIPK in der androgenabhängigen Transkription eine wichtige Rolle zukommt, da die Reduktion des endogenen Expressionslevels die Effektivität der Transkription deutlich verringerte.

## 2.8. Mögliche Phosphorylierungssubstrate der ZIPK im Rahmen der Transkriptionsinitiation

Nach diesen Erkenntnissen erhob sich die Frage nach dem Mechanismus, mit dem die ZIPK ihre Koaktivatorfunktion ausübt. Da ihre Kinaseaktivität für ihre Funktion essentiell zu sein scheint, war es nun das nächste Ziel, das Substrat der Kinase im Rahmen der Transkription



---

zu identifizieren. In Betracht kam zunächst der Androgenrezeptor selbst, dieser besitzt vier potentielle ZIPK-Phosphorylierungsstellen, wodurch eine direkte Phosphorylierung des Rezeptors naheliegend erschien. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Versuche unternommen, eine mögliche Phosphorylierung zu zeigen. Es konnte jedoch auch in Kombination mit AATF keine Phosphorylierung *in vitro* nachgewiesen werden. Damit ist eine Phosphorylierung *in vivo* zwar nicht ausgeschlossen, es wäre aber auch denkbar, dass andere Substrate für den Effekt der ZIPK verantwortlich sind; so kämen beispielsweise andere Kofaktoren oder Chromatinproteine in Betracht.

So wäre beispielsweise die nachgewiesene H3-Phosphorylierung am Threonin 11 ein möglicher Kandidat, denn dadurch könnten „Chromatin Remodelling“-Prozesse initiiert werden. Erste Ergebnisse die zeigen, dass diese Histonphosphorylierung tatsächlich an aktiven androgenabhängigen Promotoren nach hormoneller Induktion verstärkt nachweisbar ist, konnten bereits erzielt werden (Felten, unveröffentlicht). Dieser Befund unterstützt somit die Vorstellung, dass die ZIPK ihre Funktion über die Phosphorylierung von H3 ausübt.

## 3. Diskussion

### 3.1. Die ZIPK in der Transkription

Die ZIPK ist eine Serin- und Threoninspezifische Proteinkinase aus der Familie der DAP-Kinasen (Scheidtmann, 2007). Sie ist kernständig und verhält sich während der Mitose ähnlich wie ein „Chromosomal Passenger“. Hierbei ist die von ihr betriebene Phosphorylierung von Histon H3 an Threonin 11 an den Centromeren der Metaphasechromosomen nachweisbar (Preuß *et al*, 2003 b). Dadurch ist eine Funktion an der Steuerung der Mitose naheliegend. Ihre Expression ist jedoch über den gesamten Zellzyklus relativ gleichmäßig, was für rein mitotische Proteine untypisch ist. Ihre Familienzugehörigkeit gliederte die ZIPK von Anfang an auch in die Apoptosesteuerung ein. Hierzu sind diverse Veröffentlichungen erschienen, mit Theorien für die Beteiligung der ZIPK an der Auslösung apoptotischer Prozesse. Da die bislang schlüssigste Theorie besagt, dass dazu die Translokation der Kinase in das Cytoplasma und die dortige Interaktion mit Par-4 nötig ist (Page *et al*, 1999; Vetterkind *et al*, 2005), bleibt offen, welche Funktion die ZIPK im Interphasenkern einer Zelle haben könnte. Eine der Hauptaufgaben des Zellkerns ist jedenfalls die regulierte Produktion von mRNA und Ribosomen. Da die Apoptoseforschung in den späten 90er Jahren sehr vom Zeitgeist erfüllt war, geriet in Bezug auf die ZIPK eine wichtige Tatsache in den Hintergrund. Nämlich, dass mehr als die Hälfte der für die ZIPK beschriebenen Interaktionspartner Transkriptionsfaktoren oder zumindest transkriptionsrelevante Proteine sind. Diese Fakten legen eine Funktion der Kinase in der Regulation von Transkriptionsprozessen nahe. Jedoch wurden über ihrer Funktion in der Transkriptionssteuerung bisher nur wenige Daten veröffentlicht.

Harald Engemann zeigte (2002) zuerst die Möglichkeit auf, dass die ZIPK über die Interaktion mit CDC5 das RNA-Spleißen beeinflussen könnte. Erst 2005 wurde von Sato und Mitarbeitern ein konkreter Effekt der ZIPK auf die STAT3-vermittelte Transkription beschrieben. Bei der Vielfältigkeit ihrer weiteren Interaktionspartner ist es jedoch unwahrscheinlich, dass dies der einzige Transkriptionsprozess ist, den die ZIPK mitbestimmt. Zwei ihrer Interaktionspartner, Par-4 und AATF, haben eine beschriebene Funktion in der androgenrezeptorvermittelten Transaktivierung. Daher erschien es konsequent zu überprüfen, ob die Expression der ZIPK auch einen Effekt auf die Transkriptionsrate androgenabhängiger Promotoren hat.

### **3.2. Identifizierung der ZIPK als Koaktivator des Androgenrezeptors**

Unter einem Kofaktor versteht man in Bezug auf Transkriptionsfaktoren ein Protein, das einen direkten funktionellen Einfluss auf die Aktivität der Transkription hat und mit dem Transkriptionsfaktor im Rahmen der Transkriptionsinitiation eine Bindung eingeht. Je nach Einfluss des Kofaktors auf die Transkription unterscheidet man zwischen Koaktivatoren und Korepressoren.

Mittels transienter Transaktivierungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Expression der ZIPK die Transkriptionsrate von androgenabhängigen Promotoren auf ein Vielfaches steigert. Dass die Expression der ZIPK wie auch die Expression von AATF für sich eine Vervielfachung der Transkriptionsaktivität bewirken kann, zeigt, dass beide Proteine eine Funktion besitzen, welche die Effizienz der Transkription in diesem Modellsystem begünstigt. Der virale MMTV-Promotor ist in der Steroidforschung ein allgemein akzeptiertes Modell zur Untersuchung von Transkriptionsraten, die durch Steroidrezeptoren initiiert werden. Dieses Tumovirus ist auf die reproduktiven Gewebe der Maus spezialisiert und wird erst aktiviert, wenn auch das reproduktive Gewebe durch Sexualhormone zur Aktivität stimuliert wird. Es besitzt dazu sechs palindromische Steroidresponseelemente in Reihe, die auf Testosterone und Glukokortikoide ansprechen. Obwohl sich der MMTV-Promotor gut eignet, um die relativen Effekte von Mutationen der Rezeptoren oder die Funktion von Kofaktoren zu studieren, muss beachtet werden, dass es sich hierbei um einen Modellpromotor handelt, der nicht als Beispiel für endogene Promotoren dienen kann.

Dieser Promotor ist im Vergleich zu endogenen Promotoren mit ihren komplexen und weiträumigen Enhancer- und Silencerelementen relativ simpel und klein. Er kann möglicherweise deshalb besonders gut die Steroidrezeptoraktivität als Transkriptionseffizienz abbilden. Dies zeigt sich auch darin, dass sowohl AATF als auch die Kinase ohne den ektopisch exprimierten Androgenrezeptor keine nennenswerte Steigerung der Basisaktivität bewirken.

Der PSA-Promotor dient als Beispiel für ein endogenes Gen. Es kodiert für eine extrazelluläre Protease, die im Verdacht steht, Tumowachstum und die Metastasierung zu fördern. In der Diagnostik wird unter anderem der PSA-Blutspiegel als Indiz für Tumorerkrankungen herangezogen. Daher ist der PSA-Promotor der am besten erforschte Androgen-„Responsepromotor“ und wird in der Forschung gerne als Standardbeispiel herangezogen. Obwohl der Basispromotor des PSA-Gens ohne seinen Enhancer relativ schwach ist, konnte auch hier der Zusammenhang der ZIPK-Expression und der androgenabhängigen Promotoraktivität reproduziert werden. Dieser Effekt könnte bei einem Konstrukt mit Enhancer natürlich noch stärker ausfallen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die ZIPK auch an der Regulation von endogenen Promotoren beteiligt sein könnte und dass auch in diesem Fall die Promotoraktivität durch den gleichen Mechanismus unterstützt wird. Zusätzlich konnte auch am p21-Promotor ein ähnlicher Steigerungseffekt durch die ZIPK beobachtet werden. Demnach kann man annehmen, dass der Koaktivatoreffekt der Kinase auch an anderen endogenen androgenabhängigen Promotoren zum Tragen kommt.

Der Effekt der ZIPK auf die Transkriptionsaktivität ist eindeutig ein spezifischer Koaktivatoreffekt der ZIPK im Zusammenspiel mit bestimmten Transkriptionsfaktoren. Zum einen bleiben unspezifische Reporterkonstrukte völlig unberührt von der Kinaseexpression, und zum anderen erfahren die hier untersuchten Reporterkonstrukte, mit Ausnahme von p21, ohne den jeweiligen Transkriptionsfaktor und ohne Induktion kaum eine Aktivitätssteigerung durch die Expression der ZIPK.

Der Promotor des Zellzyklusinhibitors p21 ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, denn er wird auch von anderen Signalwegen wie STAT3 und p53 angesprochen (Jerry *et al* 2002; Bellido *et al* 1998; Battle und Frank, 2002).

Die Tatsache, dass auch die p53-abhängige Transkription am p21- und MDM2-Promotor von der ZIPK gesteigert wird, deutet an, dass die ZIPK an der Transkriptionsaktivierung beteiligt sein könnte, die in Abhängigkeit von diesem zentralen Tumorsuppressor steht. Es konnte damit auch gezeigt werden, dass der von Sato *et al* (2005) beschriebene Stabilisierungseffekt der ZIPK auf den endogenen p21-Proteinspiegel durch diesen Einfluss auf Transkriptionsebene ergänzt wird, und nicht nur auf der posttranslationalen Phosphorylierung durch die ZIPK beruht. Die ZIPK zeigt somit eine spezifische Koaktivatorfunktion auf wichtige Transkriptionsprozesse, wobei ihre Funktion auf ihrer Aktivität als Kinase basiert.

Die Tatsache, dass die inaktive Kinase in allen Fällen keinen Steigerungseffekt bewirkt, zeigt dass ihre Funktion in der Transkription eindeutig auf ihrer enzymatischen Aktivität beruht. Jedoch ist diese Mutation in diesem Zusammenhang nicht dominant negativ, denn die Reporteraktivität wird auch nicht reduziert. Offenbar wird durch die Expression der Mutante die Aktivität der endogenen ZIPK nicht beeinträchtigt.

Möglicherweise war lediglich das Induktionsintervall von 24 Stunden, welches für Experimente mit der aktiven Kinase optimiert wurde, zu lang. Es sollte daher experimentell gezeigt werden, ob möglicherweise nach einem sehr kurzen Induktionsintervall, von ein bis zwei Stunden, ein negativer Effekt durch die Inaktivierung der ZIPK auf die Promotoraktivität messbar ist.

### 3.3. Die ZIPK wird über zwei getrennte Domänen an den Androgenrezeptor assoziiert

Um der klassischen Definition für Koaktivatoren des Androgenrezeptors zu entsprechen, müsste auch eine Interaktion mit der ZIPK nachweisbar sein. Mittels Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass Rezeptor und Kinase *in vivo* eine physische Bindung eingehen. Sowohl die ektopisch exprimierten, als auch die endogenen Proteine konnten in Abhängigkeit vom Hormon als Komplex isoliert werden. Somit erfüllt die ZIPK die beiden wichtigsten Kriterien für Koaktivatoren, da sie erstens für einen messbaren Aktivierungseffekt sorgt, und zweitens im Komplex mit dem aktiven Androgenrezeptor nachgewiesen werden kann.

Um die Interaktionsdomäne seitens der ZIPK zu kartieren, wurden verschiedene Deletionskonstrukte eingesetzt. Die Deletion der gesamten Kinasedomäne bis zur Aminosäure 275 konnte die Kopräzipitation nicht stören. Umgekehrt war die Kinasedomäne alleine ohne die C-terminale Domäne nicht bindungsfähig. Demnach ist die Interaktion auf die nichtkatalytische Domäne der Kinase eingegrenzt. Die stückweise Deletion vom C-Terminus aus zeigte, dass der Bereich 275-334 noch genügte um die Kinase mit dem Rezeptor zu präzipitieren. Allerdings war die Deletion des entsprechenden Bereiches nicht ausreichend um die Kopräzipitation vollständig zu unterbinden. Erst durch die zusätzliche Deletion des C-terminalen Leucinzippers, der Interaktionsdomäne für AATF, entsteht eine Deletionsmutante, welche nicht mehr mit dem Rezeptor interagiert. Also gibt es offenbar zwei diskrete Bereiche in der nichtkatalytischen Domäne der ZIPK, welche der Kinase die Fähigkeit geben mit dem Androgenrezeptor einen Komplex zu bilden. Somit deutet sich an, wie die Kooperation von ZIPK und AATF auf molekularer Ebene funktionieren könnte. AATF bindet direkt an den Androgenrezeptor (Leister *et al*, 2003) und vermag die ZIPK über ihren Leucinzipper zu binden. Die Anlagerung der Kinase wird dabei durch eine weitere Interaktionsfläche stabilisiert, die direkt hinter der Kinasedomäne liegt. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass noch weitere Bindungspartner an der Interaktion beteiligt sein könnten. Es ist auch möglich, dass in der räumlichen Struktur der ZIPK die beiden getrennten Bereiche in unmittelbarer Nähe liegen und eine gemeinsame Kontaktfläche bilden, wobei der Leucinzipper für die mechanische Bindung nötig ist, und der zweite Bereich die Spezifität der Interaktion bestimmt. Die Röntgenanalyse der Kristallstruktur der ZIPK wird schlussendlich die räumliche Struktur der nichtkatalytischen Domäne definieren, und zeigen, ob es sich um ein gemeinsames oder zwei getrennte Interaktionsmotive handelt. Andererseits würde sich möglicherweise die mittig gelegene Region (274-333) der ZIPK als Köder im Zwei-Hybrid-Experiment eignen, um ein potentielles Bindeglied zum Androgenrezeptor zu identifizieren.

Da weder *in vitro* noch im Zwei-Hybridsystem eine direkte Interaktion der ZIPK mit dem Androgenrezeptor festgestellt werden konnte, ist eine indirekte Interaktion am wahrscheinlichsten. So könnte angenommen werden, dass neben AATF die zweite Kontaktfläche für den Bereich hinter der Kinasedomäne (275-333) nicht der Androgenrezeptor selbst sein muss. Es ist nicht auszuschließen, dass die ZIPK dort auch von weiteren Kofaktoren oder Chromatinproteinen innerhalb des Promotorkomplexes gebunden wird. Kandidaten gibt es unter der Vielzahl von Interaktionspartnern und Koaktivatoren des Androgenrezeptors reichlich. Über 200 verschiedene Proteine stehen im Verdacht, an der Transkriptionsregulation von Steroidrezeptoren beteiligt zu sein (Moehren *et al*, 2004). Interessanterweise hat sich bei der genauen Analyse der sterischen Struktur klassischer Koaktivatoren wie SRC oder p300 gezeigt, dass diese sehr großen Proteine nur in bestimmten Bereichen überhaupt eine definierte Struktur haben, und mit recht großen Bereichen flexibel auf weitere Kofaktoren reagieren können. So können die Initiationskomplexe von Promotor zu Promotor durchaus unterschiedlich in Struktur und Zusammensetzung sein (Glass und Rosenfeld, 2000), und dennoch zu vergleichbaren Promotoraktivitäten führen.

Es ist außerdem anzunehmen, dass Steroidrezeptoren praktisch nie als einzelne freie Moleküle vorliegen, sondern ständig von diversen Proteinen gebunden sind. Entweder werden sie von Chaperonen im Cytoplasma inaktiv gehalten, oder sie sind in transienten Komplexen an andere Proteine aus dem Bereich des Kernimports, der Transkription bis hin zum proteasomalen Abbau gebunden. Möglicherweise konnten deshalb auch keine positiven Ergebnisse im Zwei-Hybridsystem oder im *in vitro*-Experiment erzielt werden, weil für die Assoziation der ZIPK nicht der Rezeptor selber ausreicht, sondern sich ein größerer Multiproteinkomplex bilden muss, der eine viel größere Vielfalt an Funktionen und Interaktionsmotiven exponiert als der Rezeptor selber. Auch die *in vitro* fehlenden Chaperone könnten der Grund sein, dass der Rezeptor möglicherweise nicht die nötige Struktur annimmt. Oder es fehlen spezielle posttranslationale Modifikationen, die nur von Enzymen in Säugerzellen ausgeführt werden können. Auch könnte in diesem Versuch die N-terminal fusionierte DNA-Bindedomäne an der ZIPK oder die künstliche Aktivierungsdomäne am Androgenrezeptor die Interaktion stören.

### **3.4. AATF und die ZIPK kooperieren in ihrer Koaktivatorfunktion und ihrer Interaktion mit dem Rezeptor**

AATF wurde schon früh als Interaktionspartner der ZIPK identifiziert (Page *et al*, 1999). Parallel wurde AATF als Interaktionspartner der RNA-Polymerase II entdeckt (Fanciulli *et al*, 2000). Wir konnten zeigen, dass AATF ein potenter Koaktivator der steroidabhängigen Transkription ist (Leister *et al*, 2003). Dies war der Hauptgrund, warum die ZIPK als Interaktionspartner von AATF auf eine mögliche Funktion in diesem Zusammenhang getestet wurde.

In Koexpression bewirken AATF und die ZIPK den größten Steigerungseffekt. Dieser war in der Regel größer als die Summe beider Einzeleffekte. Vermutlich zeigt dieser Befund, dass sowohl AATF als auch die ZIPK ihr volles Koaktivatorpotential nur entfalten können wenn sie beide im Übermaß für den Aufbau von Transkriptionskomplexen zur Verfügung stehen. In vielen Experimenten erreichte die Promotoraktivität sogar einen Wert, der dem Produkt der Einzeleffekte nahe kommt. Der Einfluss der Kinase auf die Promotoraktivität steigt jedenfalls in Anwesenheit von AATF an, was als Indiz für eine kooperative Funktion gewertet werden kann.

Dadurch wurde schon eine gegenseitige Abhängigkeit deutlich, die sich mittels Koimmunpräzipitationen bestätigen ließ.

Die zusätzliche Expression von AATF stabilisiert die Bindung der ZIPK an den Rezeptor. Es erscheint wahrscheinlich, dass AATF eine Adapterfunktion für die ZIPK ausübt. AATF könnte über seinen Leucinzipper die ZIPK mit dem aktiven Androgenrezeptor verbinden. Folgerichtig stört die Mutation des Leucinzippers die kooperative Bindung und auch die kooperative Transaktivierung. Jedoch ist die Aktivitätseinbuße relativ gering, was wiederum dazu passt, dass es neben dem Leucinzipper noch eine weitere Interaktionsdomäne in der Kinase gibt.

Die zusätzliche Inaktivierung der Lx-Motive von AATF stört dessen Koaktivatorfunktion in der Transaktivierung am deutlichsten (Leister *et al*, 2003). Auch die Interaktion der Kinase mit dem Rezeptor wird durch diese Mutante von AATF nicht mehr stabilisiert. Folgerichtig stört die Expression dieser Mutante die kooperative Koaktivierung von AATF und ZIPK am empfindlichsten. Wie zu erwarten war, spielt AATF also für die Koaktivatorfunktion der ZIPK eine zentrale Rolle, indem es einerseits den Rezeptor über seine Lx-Motive bindet und andererseits mit der Kinase über den Leucinzipper interagiert und ihr so die nötige Interaktionsoberfläche für eine stabile Bindung an den aktiven Androgenrezeptor bietet.

Die Interaktion zwischen ZIPK und dem Androgenrezeptor unterscheidet sich damit grundlegend von der Bindung, die für STAT3 mit der Kinase beschrieben wurde. Im hier untersuchten Zusammenhang wird die ZIPK über ihre nichtkatalytische Domäne gebunden,

so dass die Kinasedomäne nicht in die sterische Struktur des Komplexes eingebunden sein muss. Sie wäre damit frei beweglich, wodurch sie für verschiedene Phosphorylierungen zur Verfügung stehen könnte.

Dagegen ist es bei STAT3 die Kinasedomäne, welche die Interaktion vermittelt, und STAT3 ist auch das Substrat der ZIPK in diesem Zusammenhang (Sato *et al*, 2005). Es wurde allerdings für die Interaktion mit STAT3 auch nicht gezeigt, dass es sich hierbei um konkrete Transkriptionsinitiationsprozesse handelt. Möglicherweise beruht der Effekt der ZIPK in diesem Zusammenhang lediglich auf einer Stabilisierung oder Hyperaktivierung mittels Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors, die nicht zwingend am Promotor stattfinden muss.

### **3.5. Die Expression der ZIPK ist für eine effiziente Transkription essentiell**

Mit Hilfe der siRNA-Transfektion konnte die Expression der ZIPK in zwei Zelllinien deutlich gesenkt werden. Der Unterschied in der Effizienz der Repression könnte auf die endogene ZIPK-Menge zurückzuführen sein, welche in LNCaP-Zellen deutlich höher liegt als in den HEK293-Zellen (Leister, unveröffentlicht). Anhand des kotransfizierten MMTV-Luciferase-reporters wurde deutlich, dass die ZIPK einen essentiellen Einfluss auf die androgenabhängige Transaktivierung besitzt. Je nach Effektivität der Repression wurde die Promotoraktivität um 50 bis 70 % reduziert.

Die Reporteraktivität wurde jedoch nie komplett unterbunden, was zum einen daran liegen kann, dass mit der siRNA-Technik nie eine Repression von 100 % erreicht wurde, wie die durchgeführten Western Blots gezeigt haben. Zum anderen ist es durchaus nicht ungewöhnlich, dass sich die Funktionen von verschiedenen Kinasen überschneiden. So ist es gut möglich, dass es noch weitere Kinasen gibt, die eine ähnliche Funktion in der Transkription ausüben und so den Verlust der ZIPK-Aktivität kompensieren können. Die wahrscheinlichste Erklärung ist jedoch, dass sich auch ohne die ZIPK ein Promotorkomplex entwickelt, der eine gewisse Restaktivität besitzt, so dass er schließlich zur Transkription, jedoch in geringerem Maße, führt.

Möglicherweise würden sich noch deutlichere Auswirkungen der siRNA-Repression messen lassen, wenn man die Induktionszeit reduziert. Denn dadurch würden die Zellen mit effektiverer Transkriptionsinitiation deutlich höhere Luciferasewerte erzeugen als Zellen, in denen die Transkriptionsmaschinerie erst langsamer in Schwung kommt.



### **3.6. Die ZIPK partizipiert schon an sehr frühen Ereignissen in der Transkriptionsinitiation**

Das androgenabhängige Transaktivierungssystem eignet sich besonders gut, um die Funktion eines Kofaktors einzugrenzen, da es sich sehr einfach und präzise durch die Hormonzugabe zu einem genau definierten Zeitpunkt starten lässt. Indem man dann die Zeitspanne ermittelt, ab dem Transkriptionsfaktor und Kofaktor nach der Induktion im Komplex nachweisbar sind, lässt sich ableiten, für welche Prozesse der Kofaktor verantwortlich sein könnte.

Die Bindung der ZIPK an den Rezeptor erreicht schon nach 30 Minuten ihren Höhepunkt, bleibt aber noch langfristig über mindestens eine Stunde bestehen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Steroidrezeptoren etwa 20 Minuten benötigen, um im Kern an den Promotoren nachweisbar zu werden (Kang *et al*, 2004). Etwa nach 1,5 Stunden ist die gesamte Rezeptorpopulation in den Kern eingewandert. Die ersten Koaktivatoren wie beispielsweise die Histonacetyltransferase SRC1 erscheinen zeitgleich mit dem Rezeptor am Promotor, während viele allgemeine Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren etwas verzögert am Promotor nachweisbar werden (Kang *et al*, 2004). Die Modifikationen an den Histonarmen werden gleichzeitig mit ihrem ausführenden Enzym am Chromatin detektierbar. Möglicherweise liegen wenige Sekunden dazwischen, dies ist jedoch mit der Methode der Chromatin-Immunpräzipitation nicht aufzulösen. Die RNA-Polymerase erscheint jedoch erst mit etwa 15 Minuten Verzögerung am Promotor (Kang *et al*, 2004). Entsprechend muss man davon ausgehen, dass etwa in den ersten 15 Minuten, nachdem der Rezeptor an seinem „Responseelement“ angedockt hat, die ersten grundlegenden Reorganisationen des Chromatins bewerkstelligt werden (Mellor, 2006).

Dies ist auch die Zeitspanne, in der die ZIPK die deutlichste Bindung an den Rezeptor aufweist. Man könnte also davon ausgehen, dass die Kinase zur Zeit der initialen Promotoraktivierung mit ihrer Phosphorylierung ihren Beitrag zur Reifung des Promotorkomplexes und möglicherweise auch zur Auflockerung des Chromatins leistet.

Diese Annahme passt zu der aktuellen Vorstellung über die Funktion von AATF. Auch für AATF ist eine Beteiligung an frühen Prozessen der Promotoraktivierung gezeigt worden, etwa durch das Verdrängen von Histondeacetylasen vom pRB/E2F-Komplex (Bruno *et al*, 2002). Da die ZIPK mit AATF kooperiert, könnte man angesichts der Zeitreihe schließen, dass es sich hierbei um einen neuen Mechanismus in der frühen Promotoraktivierung handelt. Beispielsweise könnte die Affinität der Histondeacetylasen durch die Phosphorylierung durch die Kinase reduziert werden. ZIPK ist auch zu späteren Zeitpunkten (4 und 8 Stunden nach der Induktion) noch im Komplex mit dem Rezeptor nachweisbar (unveröffentlicht). Die Bindung in den ersten 90 Minuten war aber stets am deutlichsten. Dies

könnte darauf hindeuten, dass die ZIPK vor allem in der Initiation eine Rolle spielt, und sie dann nur noch in geringerem Maße für die Aufrechterhaltung des Signals in der Peripherie des Promotorkomplexes verbleibt.

Für AATF ist jedoch offen, ob es einer ähnlichen Dynamik unterliegt. Unter Berücksichtigung der Befunde, dass der Androgenrezeptor nicht zyklisch, sondern bis zu 16 Stunden stetig ansteigend am PSA-Promotor bindet (Wang *et al*, 2004), wäre es auch denkbar, dass AATF seine verschiedenen Interaktionspartner in zeitlicher Abfolge assoziiert. So erschiene es sinnvoll, dass AATF zunächst Histonacetylasen und die ZIPK an den Promotor bringt und später dann durch die Interaktion mit TSG101 die Stabilität des Androgenrezeptors und damit vielleicht auch des gesamten Transkriptionskomplexes begünstigt. Damit wäre AATF ein wichtiges Rückradprotein des Promotorkomplexes, welches für eine effiziente Transkription garantiert.

### **3.7. AR, AATF und ZIPK bilden gemeinsame Komplexe an aktiven Promotoren**

Die Zeitreihenuntersuchung belegte die frühzeitige Komplexbildung der ZIPK mit dem Androgenrezeptor. Nach einer halben Stunde sind zwar schon viele Rezeptoren an ihren Promotoren gebunden, es sind jedoch auch noch viele Rezeptoren im Kern frei oder noch im Begriff, in den Kern einzuwandern. Entsprechend ließ sich auch nicht ausschließen, dass die ZIPK zusätzlich beim Transport und der Positionierung des Androgenrezeptors im Kern mitwirkt. Der Beweis, dass AATF und die ZIPK auch Teil des DNA-gebundenen Transkriptionskomplexes sind, ergab sich schließlich aus den Ergebnissen der Chromatin-Immunpräzipitation.

Hiermit ist es möglich, Proteine zu identifizieren, die zum Zeitpunkt der Fixierung der Zellen in unmittelbarer oder indirekt an einzelne DNA-Abschnitte gebunden sind. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl AATF als auch die ZIPK am Enhancer und dem Promotor des PSA-Gens in ähnlicher Zeitabfolge nachweisbar sind, wie der Androgenrezeptor selber.

Nachdem zuvor bereits viele Fakten für die Kooperation der ZIPK mit AATF gesammelt werden konnten, wurde mittels aufeinanderfolgenden Immunpräzipitationen der Promotorkomplexe folgerichtig gezeigt, dass sowohl AATF als auch der Androgenrezeptor in denselben Transkriptionskomplexen vorliegen wie die ZIPK. Dieses Ergebnis könnte als Hinweis auf einen trimeren Proteinkomplex aus Rezeptor, AATF und Kinase an der DNA gewertet werden. Die Methode beweist aber lediglich, dass alle drei Proteine entlang von ein bis zwei Kilobasen großen DNA-Fragmenten gebunden waren. Aufgrund der Ergebnisse der

Koimmunpräzipitationsstudien erscheint es aber sehr wahrscheinlich, dass alle drei Proteine in einem Komplex am Promotor gebunden sind.

Da weder AATF noch die ZIPK die Möglichkeit haben selbst an die DNA zu binden, wird dieser Komplex durch die Interaktion des Androgenrezeptors positioniert. Es ist beschrieben, dass sich am PSA-Promotor die DNA zwischen Enhancer und Promotor in einer großen Schleife von etwa vier Kilobasen um den Transkriptionsstartpunkt legt (Wang *et al*, 2004). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um einen einzigen aber größeren Multiproteinkomplex, in dem auch AATF und ZIPK an den Rezeptor gebunden vorliegen. Dieser ist wahrscheinlich an einer Seite an den Enhancer und auf der anderen Seite an den Promotor gebunden. Unter Berücksichtigung der Vielfalt von Kofaktoren und potentiellen Interaktionen muss das vorliegende Detailergebnis folglich so interpretiert werden, dass ein solcher trimere Verband nur einen kleinen Teil der im initialen Promotorkomplex zusammenwirkenden Proteine darstellt.

Dass die ZIPK schon nach etwa 90 min etwas schwächer an den Enhancer gebunden zu sein scheint, könnte an den von Kang *et al* (2004) gezeigten Schwankungen in den ersten zwei Stunden am Promotor liegen. Möglicherweise wird gerade in diesen ersten Stunden der Promotorkomplex in mehreren Schüben dynamisch weiterentwickelt und umgestaltet, bis er schließlich zum effektiven Transkriptionsinitiator gereift ist. Für weitere Experimente könnte es interessant sein, ob sich die Daten der Koimmunpräzipitation mit den Chromatinpräzipitationen auch noch für spätere Zeitpunkte (z.B. 4, 8 und 16 Stunden) nach der Induktion decken, oder ob die Kinase möglicherweise auch vom Rezeptor gelöst noch in räumlicher Nähe zum Chromatin verbleibt, um die Transkriptionsaktivität langfristig zu unterstützen.

### **3.8. AATF ein multifunktionaler Koaktivator**

AATF kristallisiert sich mehr und mehr als Multifunktionsprotein in der Transaktivierung heraus. Neben der ZIPK assoziiert es auch mit TSG101 (Burgdorf *et al*, 2004), welches den aktiven Androgenrezeptor stabilisiert und vor dem proteasomalen Abbau schützt. Zusätzlich sorgt es für einen Wechsel von Histondeacetylasen zu Gunsten von Histonacetyltransferasen (Fanciulli *et al*, 2000). So könnte AATF auch über Bridge-1, ein Adapterprotein, dass von Sarah Appel als Interaktionspartner von AATF identifiziert wurde (unveröffentlicht), indirekt an die Histonacetylase p300 binden (Lee *et al*, 2005). p300 ist ein gut charakterisierter Koaktivator von verschiedenen streng regulierten Transkriptionsprozessen, wie beispielsweise der Steroidrezeptoren.

Offen ist allerdings, ob AATF seine unterschiedlichen Interaktionspartner in jedem Promotorkomplex rekrutiert. Beispielsweise konnte die Kooperation mit TSG101 und der

ZIPK bislang nicht auf den Estrogenrezeptor ausgeweitet werden (unveröffentlicht.). Es bleibt jedoch die Unsicherheit, ob sich künstliche Reporterkonstrukte, wie das hierbei verwendete ERE-TATA-Konstrukt, so verhalten wie endogene estrogenabhängige Promotoren. Es wäre weiterhin interessant zu untersuchen, ob sich die ZIPK auch bei den anderen von AATF regulierten Promotoren als kooperativer Koaktivator herausstellt. Gerade der Einfluss auf den Restriktionspunkt wäre in Hinsicht der Beteiligung der ZIPK an der Zellzyklussteuerung interessant.

Auch in der AATF vermittelten „DNA-damage-response“ und Regulation von p53 wäre der Einfluss einer Kinase aus der DAPK-Familie hochinteressant. Da bei der Regulation von p53 die Ubiquitinierung durch MDM2 eine wesentliche Rolle spielt, wäre auch hier ein deutlicher Steigerungseffekt durch TSG101 als inaktive Ubiquitinligase denkbar. Auch AATF selbst unterliegt der Regulation durch die proteasomale Degradation, hierbei spielt Pin1 eine Prolylisomerase und coaktivator von Steroidrezeptoren (Yin *et al*, 2005), die jüngst als neuer Interaktionspartner von AATF beschrieben wurde eine Rolle (DeNicola *et al*, 2007). Diese kann bei AATF eine Konformationsänderung bewirken, die es ermöglicht, dass AATF von MDM2 gebunden und Ubiquitiniert wird. Die Degradation von AATF korrelierte dabei mit der Induktion der Apoptose. Die Potentielle Phosphorylierungsstelle für die ZIPK in MDM2 (Burch *et al*, 2004) lässt einen Einfluss der ZIPK auf diesen Mechanismus erwarten.

Parallel zu den vorliegenden Untersuchungen wurde in unserer Arbeitsgruppe auch noch ein neuer Interaktionspartner von AATF untersucht. Hierbei handelte es sich um ein relativ kleines Protein von 169 Aminosäuren, das AATF über seinen Leucinzipper bindet (Felten *et al*, 2007). Das Protein war zuvor beschrieben als Blos2 (Starcevic und Dell'Angelica, 2004), der zweiten Untereinheit des BLOC1-Proteinkomplexes, der für die Reifung von Lysosomen verantwortlich ist. Das Protein zeigt über einen weiten Bereich von etwa 65 Aminosäuren eine Homologie zu She3p, einem Hefeprotein, das als Transportadapter für mRNA-Transporte beschrieben wurde und zwischen dem RNA-Bindeprotein und dem Motorprotein, in der Hefe Myosin V, vermittelt (Gonsalvez *et al*, 2004).

Interessanterweise zeigte sich in Transaktivierungsexperimenten, dass auch die Expression von Blos2 die Effektivität der vom Androgenrezeptor oder von p53 initiierten Transkription steigert. Blos2 kolokalisiert darüber hinaus mit den drei bekannten Myosin V-Isoformen, was eine Beteiligung an Transportprozessen nahe legt. Es deutet sich an, dass AATF auch eine neue Verknüpfung zu RNA-Transportprozessen in sich bergen könnte, wobei die Interaktion von AATF mit Blos2 eine Rolle spielt. Passend dazu bewirkt Blos2 in Koexpression mit AATF in einigen Zellen dessen Export aus dem Kern, was zu einer deutlichen Kolokalisation im Cytoplasma führt.

### **3.9. Die Kinaseaktivität der ZIPK spielt eine wichtige Rolle in der Lokalisation von Rezeptor und Kinase**

In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zeigte sich, dass nur die aktive ZIPK im Kern in Speckles lokalisiert ist, wogegen die inaktive Mutante diffus im Zellkern verteilt ist. Es scheint als sei die enzymatische Aktivität der Kinase für ihre Lokalisation ausschlaggebend. Dies ist ein interessantes Phänomen, und es bedürfte weiterer Untersuchungen um zu verstehen, welcher Mechanismus diesem Verhalten zugrunde liegt. Unter der Voraussetzung, dass es sich bei den Speckles um Zentren transkriptioneller Aktivität handelt, könnte diese Beobachtung begründen, dass die Expression dieser Mutante die Transkription nicht in negativer Weise beeinflusst. Denn, wenn diese Mutante nicht in diesen Strukturen angereichert werden kann, wäre zu erwarten, dass sie die dort ablaufenden Prozesse auch nicht beeinflusst.

Der aktivierte Androgenrezeptor wandert in den Kern ein und liegt dort in einem eigenen unregelmäßigem Muster vor. Es ist hierbei schwer zu sagen, welche Bereiche davon möglicherweise aktive Promotoren darstellen, denn durch die Überexpression sind sicherlich wesentlich mehr Rezeptormoleküle im Kern vorhanden als von den Responseelementen gebunden werden können. Auch bei der Anfärbung des endogenen Androgenrezeptors mittels spezifischem Antikörper zeigte sich keine strukturiertere, sondern eher eine diffuse Verteilung im Kern. Abgesehen von der früh entdeckten hormonabhängigen Translokation in den Kern, gibt es in der Literatur nur wenige Daten über Koloalisationen mit dem Rezeptor in diesem Zellkompartiment. Erst in den letzten Jahren wurde das Thema der Lokalisation und Dynamik des Androgenrezeptors im Kern von einer holländischen Arbeitsgruppe um Adrian Houtsmuller aufgegriffen (van Royen *et al*, 2007), die zeigten, dass nur eine verschwindend kleine Fraktion der Androgenrezeptoren im Kern in stabilen Komplexen eingebaut sind.

In Koexpression mit dem Androgenrezeptor zeigte sich die aktive ZIPK in ihrer Lokalisation unverändert. Die wenigen Überlagerungen erschienen eher zufällig und ließen keine gemeinsamen Strukturen erkennen. Da beide Proteine aber im Überschuss exprimiert wurden, ist es möglich, dass die wenigen tatsächlich an Promotoren gebundenen Rezeptoren sich nicht über den Hintergrund der freien Proteine absetzten. So sind beispielweise am gesamten PSA-Promotor inklusive des Enhancers nur fünf Palindrome für aktive hormonegebundenen Rezeptordimere vorhanden. Eine Ansammlung von fünf Dimeren ist für ein Fluoreszenzmikroskop viel zu klein und würde wahrscheinlich, wenn überhaupt, nur als winziges und schwaches Pünktchen erscheinen.

Wie beschrieben, sind die an die Zielpromotoren gebundenen Rezeptoren die Basis für einen größeren Multiproteinkomplex, so dass auch nicht sicher ist, ob die Epitope dieser in

Komplexen eingebetteten Rezeptoren überhaupt nach der Fixierung für den detektierenden Antikörper zugänglich sind. Außerdem handelt es sich bei den aktiven Transkriptionskomplexen um sehr dynamische Strukturen, an denen langzeitige statische Proteininteraktionen eigentlich auch nicht zu erwarten sein dürften.

Interessanterweise zeigte sich jedoch bei der Koexpression der inaktiven Mutante mit dem Androgenrezeptor eine deutliche Kolokalisation der Kinase mit dem Rezeptor. Im Gegensatz zum Wildtyp bewirkt diese Mutation, dass sich die Kinase scheinbar der Anordnung des Androgenrezeptors unterordnet. Die inaktive Mutante K42A ändert ihre Lokalisation in Anwesenheit des Androgenrezeptors und erscheint in einer fast deckungsgleichen unregelmäßigen Verteilung im Kern. Je nach Expressionsstärke entstehen dabei auffallend ähnliche Muster bis hin zur Bildung von größeren, scharf abgegrenzten Strukturen mit deutlicher Kolokalisation.

Durch die Inaktivierung vermag die Kinase offenbar stabiler an den Rezeptor zu binden als der Wildtyp, eine Beobachtung die mit den Ergebnissen der Koimmunpräzipitation verifiziert werden konnte. Es ist aber unwahrscheinlich, dass diese Komplexe die Promotoren blockieren, denn dann hätte sich das Phänomen auch in den Transaktivierungsstudien als Repression abzeichnen müssen. Auch die Tatsache, dass bei sehr starker Expression solche Strukturen auch außerhalb des Kerns erscheinen, mag obwohl die Lokalisation und Struktur an sich ein Überexpressionsartefakt ist, dennoch zusätzlich darauf hindeuten, dass die Komplexe aus inaktiven Kinasen und Androgenrezeptoren nicht DNA-gebunden sind.

Mit Blick auf die Daten aus der Chromatin- und der Koimmunpräzipitation erscheint es möglich, dass die Kinase zusammen mit AATF den Rezeptor schon vor dessen Andocken an die Promotor-DNA seiner Zielgene binden. Unter dieser Voraussetzung ließe sich spekulieren, ob das Ausbleiben der Phosphorylierung z.B. von Chromatinproteinen durch die ZIPK dem frühen Transkriptionskomplex die Möglichkeit versagt, sich mit der nötigen Stabilität an den Promotor anzulagern. Folglich würden diese rasch durch intakte Initiationskomplexe ersetzt.

### **3.10. Die Funktion der ZIPK in der Transkription**

Die gesammelten Daten deuten darauf hin, dass die Aufgabe der ZIPK im Rahmen der Transkriptionsinitiation die Phosphorylierung eines bestimmten oder mehrerer Substrate ist. Um den Mechanismus der ZIPK als Koaktivator genauer zu verstehen, wäre die Identifikation dieses Substrats essentiell.

Der Rezeptor selbst hat vier potentielle Sequenzmotive, die eine Phosphorylierung durch die ZIPK theoretisch ermöglichen sollten. Dies ist bei einer Gesamtgröße von etwa 900 Aminosäuren überdurchschnittlich, denn statistisch würde man etwa zwei erwarten.

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit keine *in vitro* Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte, kann die Möglichkeit einer *in vivo* Phosphorylierung nicht ausgeschlossen werden. Da sich *in vitro* auch keine Interaktion der beiden Proteine zeigte (unveröffentlicht), kann man davon ausgehen, dass weitere Kofaktoren, Faltungshilfen oder strukturgebende Proteine nötig sind, um einen Komplex entstehen zu lassen, der die Assoziation der Kinase ermöglicht.

Genauso gibt es unter den mittlerweile über 200 weiteren Kofaktoren der steroidabhängigen Transkription viele mögliche Kandidaten, die für eine Phosphorylierung durch die ZIPK in Frage kommen. Beispielsweise wird Par-4 im Gegensatz zu AATF von der ZIPK phosphoryliert (Vetterkind *et al*, 2005). Da seine Wirkung in den Reporterexperimenten nicht überzeugen konnte, wurde in dieser Richtung jedoch nicht weitergearbeitet. Auch um neue Substrate zu identifizieren, könnte ein „Screen“ nach Interaktionspartnern der nicht-katalytischen Domäne, vor allem des Bereichs (275-333), der ZIPK eine sinnvolle Herangehensweise sein.

In Anbetracht der jüngsten Ergebnisse erscheint aber die von der ZIPK ausgeführte Histonphosphorylierung an H3 als möglicher neuer Mechanismus der Koaktivierung in Frage zu kommen. In unserer Arbeitsgruppe konnte in ersten weiterführenden Experimenten gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Threonin 11 am Histonarm von H3 spezifisch am aktiven PSA-Promotor nachweisbar ist (Felten, unveröffentlicht).

Dies ist sehr interessant, weil es sich im Bezug auf die Transkription um eine neuartige Histonmodifikation handelt, die es nun in den Kontext des Histoncodes einzugliedern gilt. Wichtig wäre hierbei zunächst zu zeigen, dass diese Phosphorylierung im Rahmen der Transkription auch tatsächlich von der ZIPK ausgeführt wird, denn bislang ist diese Modifikation als mitosespezifisch charakterisiert worden (Preuß *et al*, 2003 b).

Im Hinblick auf die Transkription wäre es auch eine Überlegung wert, die bisher wenig untersuchte Phosphorylierung des Histon H4 durch die ZIPK zu studieren. Hier erfolgt die Phosphorylierung Threonin 81, wobei es sich nicht um den Histonarm handelt, sondern um den eigentlich basischen Bereich der DNA-bindenden Domäne. Es ist anzunehmen, dass ein Phosphatrest an dieser Stelle die Bindung des Histons an die DNA stark beeinträchtigt (Weinl, Diplomarbeit 2003). Im Bezug auf eine Relevanz in mitotischen Prozessen wurde diese Phosphorylierung daher in Frage gestellt.

Während der aktiven Transkription bewegen sich jedoch eine oder sogar mehrere Polymerasen gleichzeitig mit beachtlicher Geschwindigkeit entlang der codierenden DNA. Es erscheint möglich, dass hier eine Phosphorylierung, die das Histon vollständig von der DNA

zu lösen vermag, die Effektivität der Transkription begünstigt. Zumindest könnte am Transkriptionsstartpunkt eine komplette Ablösung der DNA von den Histonen nötig sein (Mellor, 2006). Es dürfte jedoch schwierig werden hierzu einen Beweis anzutreten, denn es ist unwahrscheinlich, dass sich diese Modifikation mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation erfassen lässt.

### **3.11. Die ZIPK im Netzwerk der Transkriptionsregulation**

Die Daten haben gezeigt, dass die ZIPK ein neuer funktionaler Koaktivator des Androgenrezeptors ist. Sie kann nur in Verbindung mit einem aktiven Transkriptionsfaktor ihre Funktion entfalten und zeigt an allgemeinen Promotoren keinen Effekt. Da die Steigerung in allen untersuchten Zelllinien reproduzierbar war, kann von einem allgemeingültigen Mechanismus ausgegangen werden.

Möglicherweise kommt AATF in der Steuerung der Kinase eine zentrale Rolle zu, denn es partizipiert in verschiedenen Transkriptionsprozessen und könnte auch in anderen Komplexen als Plattform für die ZIPK dienen. Hierbei spielt wahrscheinlich der Phosphorylierungszustand von AATF eine ausschlaggebende Rolle (Bruno *et al*, 2006).

Neben AATF wäre auch über Par-4 eine Verbindung der ZIPK zur Transkription denkbar, denn auch Par-4 ist ein androgenabhängiger Koaktivator (Gao *et al*, 2006). Jedoch konnten in transienten Reporterassays keine signifikanten Daten ermittelt werden, die auf einen Zusammenhang zwischen Par-4 und der ZIPK deuten. Par-4 hat in Einzelexpression zwar einen geringfügigen Steigerungseffekt auf den MMTV-Promotor (unveröffentlicht), in Koexpression mit AATF oder der ZIPK wurde die relative Luciferaseaktivität jedoch nicht nennenswert verändert. Es ist möglich, dass die Koaktivatorfunktion von Par-4 promotorspezifisch ist und nur am cFlip-Promotor zum tragen kommt (Gao *et al*, 2006).

Die Lokalisation der ZIPK kann zwischen Cytoplasma und dem Zellkern wechseln. Ist die Kinase im Cytoplasma, kann sie mit Par-4 kolokalisieren und die Apoptoserate der Zellen verstärken (Vetterkind *et al*, 2005). Ist sie dagegen im Kern lokalisiert könnte sie zumindest in Prostatakarzinomzellen das Überleben der Zellen durch die Unterstützung der androgenabhängigen Transkription begünstigen.

Andererseits kann sie in Verbindung mit dem proapoptotischen Protein Daxx auch aus dem Kern die Apoptose induzieren (Kawai *et al*, 2003). Passend dazu wurde Daxx auch als Repressor der androgenabhängigen Transkription charakterisiert (Lin *et al*, 2004; Mizuta und Kurode, 2004). Und auch der in dieser Arbeit vorgestellte Koaktivatoreffekt auf die p53-abhängige Transkription würde in diesem Kontext neue Perspektiven für die Funktion der ZIPK eröffnen. Die jeweilige Aufgabe der ZIPK wird möglicherweise je nach Zustand einer Zelle unterschiedlich sein und könnte sowohl von der proapoptotischen Signaltransduktion



als auch von Steroidhormonen und durch die Expression von Interaktionspartnern reguliert werden.

Es deutet sich in der Steuerung von p53 und möglicherweise auch des Androgenrezeptors noch ein weiterer Zusammenhang an. Das Expressionslevel dieser Transkriptionsfaktoren wird unter anderem durch Ubiquitinierung und folglich durch den proteasomalen Abbau mitbestimmt (Sengupta und Wasylyk, 2004; Roos-Mattjus *et al*, 2004). Zwar haben Ubiquitinligasen logischerweise einen negativen Einfluss auf die Proteinmenge dieser Transkriptionsfaktoren, aber es konnte zumindest für den Estrogenrezeptor gezeigt werden, dass die basale Transkription nach Inhibition des Proteasoms mit MG132 einbricht (Laios *et al*, 2005; Fan *et al*, 2004). Somit wird klar, dass Ubiquitinligasen wie MDM2 (Sengupta *et al*, 2001 und 2004; Lin *et al*, 2002) oder E6-AP (Gao *et al*, 2005; Khan *et al*, 2006) zum einen repressorisch wirken, da sie die Menge an Steroidrezeptoren verringern, aber andererseits auch für die korrekte Funktion der Transkriptionsinitiation unerlässlich sind.

Man geht davon aus, dass die DNA-gebundenen Transkriptionskomplexe nur wenige Transkriptionsereignisse ermöglichen und ihre Aktivität nach kurzer Zeit nachlässt. Werden diese Komplexe dann nicht durch das Proteasom entsorgt, blockieren sie den Promotor für den Aufbau neuer Transkriptionskomplexe (Fan *et al*, 2004). Die Ubiquitinierung des Rezeptors spielt hierbei eine zentrale Rolle, worauf sich auch die koaktivierende Funktion von TSG101 begründet. Dieses wird ebenfalls von AATF gebunden und schützt mit seiner inaktiven Ubiquitinligasedomäne die ersten Ubiquitinreste vor weiterer Polyubiquitinierung (Burgdorf *et al*, 2004).

Es ist zwar derzeit noch kein funktioneller Zusammenhang der ZIPK mit Ubiquitinligasen gezeigt worden, aber eine potentielle Phosphorylierungsstelle in MDM2 für die ZIPK konnte *in vitro* verifiziert werden (Burch *et al*, 2005). Darauf aufbauend wurden im Rahmen dieser Arbeit auch transiente Reporterassays durchgeführt, die auf einen Zusammenhang zwischen Kinase und MDM2 in der androgenabhängigen Transkription abzielten. Zwar waren die gemessenen Effekte relativ gering, es zeigte sich jedoch, dass die ZIPK in Anwesenheit von ektopisch exprimiertem MDM2 vom Koaktivator zum Korepressor wird (Leister, unveröffentlicht). Hier könnte sich ein weiterer autoregulatorischer „Feedback Loop“ andeuten. Während der Signalweg der ZIPK zusammen mit AATF auf den Androgenrezeptor und möglicherweise auch p53 eine Aktivitätssteigerung bewirkt, könnte sie über MDM2 selbstständig für den Abbau ihres Signals sorgen.

Für die Funktion als Histonkinase in der Transkription bleibt abzuwarten wie sich der Befund erhärten lässt, und wie sich diese neue Modifikation im Histoncode eingliedert. Es hat sich mittels FRAP-Technik („fluorescens recovery after photobleaching“) gezeigt, dass Heterochromatin extrem dynamisch ist was seine Proteinkomponenten angeht (Phair *et al*, 2005). Außer den Histonen H3 und H4 hat kaum ein Protein eine längere Verweildauer als

einige Minuten. Transkriptionsfaktoren, die unter anderem mit dem Histon H1 um den Zugang zur DNA konkurrieren, binden in vielen Fällen nur für wenige Sekunden (Bustin *et al*, 2005).

Der Histoncode wird offenbar von einem über die Zellteilung hinaus bestehenden langzeitigen Muster aus mono-, di- und tri-Methylierungen an den Lysinresten 4 und 36 bestimmt (Keogh *et al*, 2005; Bernstein *et al*, 2002). Histonmethylierungen wirken mit wenigen Ausnahmen repressiv (Joshi *et al*, 2005, Morris *et al*, 2005). Die weitaus dynamischeren Acetylierungen, vor allem an H3 (an den Lysinresten 4, 9, 14, 18 und 23) sind als Signal für instabilere, lockerere Chromatinpackung charakterisiert (Jenuwein und Allis, 2001; Mellor, 2006). Acetylierte Histone haben eine wesentlich höhere Fluidität im Chromatin, ob dabei jedoch die Säurewirkung der Acetylreste eine nennenswerte Rolle spielt ist fraglich. Wahrscheinlicher ist, dass die Gesamtheit der Modifikationen eine Interaktionsfläche bilden, die Strukturproteine mit Bromo- oder Chromodomänen binden können, welche ihrerseits wiederum die Basis für ATP-abhängige Chromatinremodelling-Komplexe wie SWI-SNF oder RSC bilden (Bruno *et al*, 2003). Auch der Angriff von Histonchaperonen wie Nap1, welche Histone vorübergehend von der DNA abschirmen, um Polymerasen die Elongation zu ermöglichen (Park *et al*, 2004) wird darauf beruhen. Hierbei werden aus dem aktiven Chromatin die H2A/H2B-Histondimere vorübergehend von der DNA entfernt, um diesen Abschnitt flexibler zu gestalten.

Welche Aufgabe Histonphosphorylierungen in diesem Kontext haben, ist noch weitgehend unbekannt. Man weiß, dass Serin 10 von H3 im phosphorylierten Zustand ein Bindungsmotiv für 14-3-3-Domänen darstellt (Wang *et al*, 2000; Tzivion *et al*, 2001), welche mit Histon-Deacetylasen interagieren, und damit ein Signal für reduzierte Promotoraktivität wären. Hierbei handelt es sich um eine Strukturdomäne, die auch in vielen Transkriptions- und Signaltransduktionskomplexen eingebaut wird. Andererseits wurde die Phosphorylierung von H3 an Serin 10 auch als Signal für die Rekrutierung von Histonacetylasen (Dunn und Davie, 2005) im Rahmen der MAP-Kinase induzierten Genaktivierung charakterisiert. Es wäre interessant, ob die Phosphorylierung von Threonin 11 diesen Effekt verstärkt, oder ob sich die beiden Signale gegenseitig ausschließen. Es hat sich jedoch auch beispielsweise am HSP70-Promotor gezeigt, dass verschiedene Signalwege in unterschiedlichen Histonmodifikationen enden, die dann aber eine vergleichbare Promotoraktivierung bewirken (Thomson *et al*, 2004).

Auch ist zu bedenken, dass verschiedenste Histonmodifikationen entlang eines aktiven Gens überaus unterschiedlich ausgeprägt sein können. Während am Promotorbereich eine sehr komplexe Kombination von Modifikationen vorherrscht, werden am Transkriptionsstartpunkt die Nukleosomen fast vollständig von der DNA gelöst, dagegen werden stromabwärts die

Histonmodifikationen vom Elongationskomplex mit dem Fortschreiten der Polymerase transient angepasst (Joshi *et al*, 2005).

Welche Funktion die Threonin 11-Phosphorylierung haben könnte, und wie weit sie sich ausdehnt, ist noch völlig offen. Es erscheint aber wahrscheinlich, dass sie zu den Signalen der Chromatinaktivierung und damit der Lockerung dient.

### **3.12. Die ZIPK, ein potentielles Target in der Krebstherapie?**

Wenn sich in weiteren Experimenten die Schlussfolgerungen dieser Arbeit erhärten lassen und die Aktivität der ZIPK zu der androgenabhängigen Transkription beiträgt, würde diese Kinase auch als potentielles therapeutisches Target für medizinische Studien interessant. Wenn die Deletion der Kinase das Wachstum von androgenabhängigen Zelllinien behindert, würde sie in das Interesse der pharmazeutischen Forschung rücken. Vor allem wegen ihrer Fähigkeit, die Expression von p21 auf verschiedenen Ebenen zu verstärken, ist sie im Zusammenhang mit Prostatakrebs hoch brisant, da in verschiedenen Untersuchungen gezeigt wurde (Baretton *et al*, 1999; Omar *et al*, 2001), dass aggressiv wachsende Prostatazelllinien auf die Expression von p21 angewiesen sind, um ihre hohe Apoptoseneigung zu unterdrücken.

Passend dazu ist der Befund, dass die ZIPK in mehreren Prostatakrebszelllinien deutlich stärker exprimiert wird als in anderen üblichen Zelllinien wie beispielsweise den HEK293 oder den Rat1-Zellen (Daten von Sarah Appel, unveröffentlicht). Die vergleichsweise stark exprimierenden MCF7-Zellen legen eine Untersuchung der ZIPK auch in Bezug auf das Wachstum von Brustkrebs nahe.

In pharmazeutischer Hinsicht wäre ein guter Inhibitor der ZIPK der naheliegendste Ansatzpunkt. Die Wirkung des einzigen für die ZIPK beschriebenen Inhibitors, H7 (1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine) (Sato *et al*, 2005; Kidaka *et al*, 1984) konnte in unserer Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (Daten von Anne Conradi, unveröffentlicht). Auch in Transaktivierungsexperimenten konnte mit H7 über einen weiten Konzentrationsbereich kein signifikanter Effekt auf die Transkriptionsaktivität gemessen werden (unveröffentlicht). Aber selbst wenn es wirken würde, wäre H7 viel zu unspezifisch, um seine Wirkung nur an der ZIPK festzumachen. H7 wirkt inhibitorisch auf verschiedene Serin/Threonin-Kinasen wie PKA (Niisato *et al*, 1999), MAP-Kinase (Tsubakie *et al*, 2007) oder PKC (Kawamoto *et al*, 1984).

Möglicherweise könnte eines Tages die Röntgenstrukturanalyse Ansatzpunkte für den Entwurf von spezifischen Peptidinhibitoren eröffnen. Denn möglicherweise wäre nicht die enzymatische Aktivität, sondern die Interaktionsdomäne, mit welcher die Kinase an den

Promotorkomplex assoziiert ein passenderer Angriffspunkt, um den Einfluss der Kinase auf die Transkription zu blockieren. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass ein Ihara und Mitarbeiter (2005) zeigen konnten, dass ein MLC-„Pseudopeptid“ die Aktivität der ZIPK *in vitro* effizient inhibieren kann.

Auch könnte die ZIPK ein neuer Ansatzpunkt sein, um die Apoptose von malignen Prostatazellen zu begünstigen. Ließe sich die Translokation der Kinase ins Cytoplasma steuern, so könnte man möglicherweise ihre Aktivität von antiapoptotisch in Richtung proapoptotisch lenken, indem man sie in Kontaktmöglichkeit mit Par-4 bringen würde. Es wurde jedoch auch veröffentlicht, dass Par-4 gerade innerhalb des Zellkerns von androgenunabhängigen Krebszellen die Apoptose auslösen kann, wobei die NLS in Par-4 essentiell sein soll (Rangnekar, 1998; Gurusurthy *et al*, 2004). Par-4 bleibt im Bezug auf die Überlebensfähigkeit von Prostatakrebszellen ein zentrales Forschungsobjekt, denn es ist in vielen Gewebeproben von Krebspatienten herunterreguliert (Barradas *et al*, 1999; Qui *et al*, 1999), und die Aktivität des Androgenrezeptors wirkt wiederum inhibitorisch auf die von Par-4 induzierte Apoptose (Sirinivasan *et al*, 2006). Möglicherweise ist die Herunterregulierung von Par-4 die einzige Möglichkeit für androgenunabhängige Krebszellen, die Aktivität der ZIPK in Bezug auf das Wachstum zu nutzen, ohne eine zu hohe Apoptoseeigung zu entwickeln.

Es wäre möglich, dass ein Gleichgewicht zwischen AATF und Par-4 die Funktion der Kinase steuert, und über die Induktion der Apoptose durch die ZIPK entscheidet (Page *et al*, 1999; Vetterkind *et al*, 2005). Hierbei könnte der Phosphorylierungszustand von AATF entscheidend sein. Denn nach Phosphorylierung durch die ATM/ATR-Kinasen wird AATF in der Transkription von p53 aktiv (Passananti und Fanciulli, 2007; Bruno *et al*, 2006). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass auch die relative AATF-Expression in vielen Tumorproben verringert ist (DiPadova *et al*, 2003), was andeutet, dass eine hohe AATF Expression in der Regel nicht förderlich ist für effektives Zellwachstum.

### **3.13. Ausblick**

Die wichtigste Frage, die sich aus dieser Arbeit ergibt ist, ob der Mechanismus der Koaktivatorfunktion der ZIPK, tatsächlich und ausschließlich über die Phosphorylierung von Threonin 11 an H3 funktioniert. Man müsste beispielsweise zeigen, dass durch das Ausschalten der ZIPK eine Reduktion dieser Phosphorylierung bewirkt wird.

Dazu würde man LNCaP-Zellen nutzen, in denen die ZIPK mittels siRNA herunterreguliert werden kann. Sollte sich dabei zeigen, dass auch die Threonin 11 Phosphorylierung im Vergleich zu normalen Zellen abnimmt, wäre dies ein starkes Indiz für diese Hypothese. In

diesem Zusammenhang sollte der vorliegende Befund, dass die Promotoraktivität ohne die ZIPK abnimmt auch für endogene Promotoren ausgeweitet werden. Durch quantitative mRNA-Analysen androgenabhängiger Gene; hierzu würde sich die mRNA-Mengen von PSA am besten eignen; ließe sich untersuchen, ob der am MMTV-Promotor gemessene Effekt auch an endogenen Promotoren zum tragen kommt. Dazu könnten beispielsweise die relativen endogenen mRNA-Mengen von PSA oder p21 mittels Northern Blot oder semiquantitativer oder „Real Time“-PCR verglichen werden.

Da alle weiterführenden Experimente auf dem Ausschalten der ZIPK, idealerweise in LNCaP-Zellen, basieren werden, wäre es sinnvoll diese siRNA-Technik zunächst grundlegend zu optimieren und zu standardisieren, um verlässliche Daten erarbeiten zu können.

Gerade mit den LNCaP-Zellen, die als Beispiel für androgenabhängige Prostatakrebszellen herangezogen werden können, wäre es dann auch möglich zu untersuchen, in wieweit die Reduktion der ZIPK die Zellwachstumsrate beeinflusst. Wenn die Reduktion der Kinase die androgenabhängige Transkription beeinträchtigt, sollten sich diese Zellen langsamer teilen, denn sie sind in ihrem Wachstum auf die Aktivität des Androgenrezeptors angewiesen. Ein solcher Befund würde auch die Bedeutung der ZIPK für die Krebsentwicklung untermauern.

Ähnliches könnte auch in MCF7-Zellen im Bezug auf den Estrogenrezeptor untersucht werden, denn deren Wachstum ist von der Aktivität des Estrogenrezeptors abhängig. Auch die Apoptoserate nach Hormonentzug sollte untersucht werden, denn es wäre möglich, dass nach Reduktion der ZIPK auch der p21-Spiegel absinkt, von dem angenommen wird, dass er für die Unterdrückung der Apoptose verantwortlich ist.

Würde man die medizinische Relevanz der ZIPK weiter ausloten wollen, müssten Gewebeproben aus möglichst vielen Tumoren auf die relative Expression der ZIPK und Par-4 als auch von AATF und p21 untersucht und statistisch ausgewertet werden. Für den Anfang würde aber zumindest eine vergleichende Expressionsanalyse der bekannten und verfügbaren Prostatakrebszelllinien erste Erkenntnisse ermöglichen.

Eine weitere Technik, die neue Möglichkeiten eröffnen würde, wäre die DNA-Chip-Technologie. Diese würde erlauben, je nach Ausführung, mehrere tausend Gene auf eine mögliche Abhängigkeit von der ZIPK-Aktivität quantitativ zu untersuchen. Damit würde sich zum einen zeigen, welche Promotoren durch die ZIPK mitgesteuert werden. Zum anderen könnte man so auch Rückschlüsse auf neue Verbindungen der ZIPK in der Signaltransduktion ziehen. In Kombination mit der Chromatinimmunpräzipitation ergäbe sich sogar die Möglichkeit im größeren Stil nach Promotoren von Genen zu suchen, die am Ende des ZIPK vermittelten Signalwegs stehen, an denen also die Phosphorylierung von H3 mittels Immunpräzipitation detektiert werden kann.

Weiterführend wäre es auch sehr interessant, die Bedeutung der H3-T11-Modifikation im Rahmen der Transkription genauer zu charakterisieren. Als neues Element des Histoncodes müsste untersucht werden, in welcher Reihenfolge und Abhängigkeit die verschiedenen Modifikationen auftreten und welche Chromatinstruktur damit einhergeht.

Dabei wäre es auch interessant zu untersuchen, ob diese Histonmodifikation spezifisch nur am Enhancer und Promotor auftritt, oder ob größere Bereiche der umgebenden DNA diesem Signal unterliegen. Diese Frage würde sich sehr einfach mit verschiedenen Oligonukleotiden (Primern) klären lassen, und zeigen, wie groß der Chromatinbereich ist, an dem die Kinase tätig ist.

AATF wird als Bestandteil der „DNA-damage-response“ und im Hinblick auf die Regulation von p53 immer interessanter. Auch in diesem Zusammenhang sollte nach Einflüssen der Kinase gesucht werden. In dieser Arbeit wurde bereits ein Koaktivatoreffekt der ZIPK auf die p53-vermittelte Transkription angedeutet, und auch AATF bewirkt eine Steigerung der von p53-abhängigen Promotoraktivität (Felten *et al*, 2007). Hier könnte die ZIPK möglicherweise über einen ähnlichen Mechanismus ihre Funktion ausüben, wie im vorliegenden Fall des Androgenrezeptors.

Um den molekularen Aufbau von Transkriptionskomplexen, in denen die ZIPK mitwirkt, besser zu verstehen, wäre es lohnenswert nach neuen Interaktionspartnern zu suchen, welche die Kinase direkt binden können. Dabei würde es sich anbieten, den Anfang der nichtkatalytischen Domäne als Köder im Zwei-Hybridverfahren einzusetzen. Mit diesem Bereich vermag sich die ZIPK am Transkriptionskomplex zu verankern. Hier müsste die ZIPK zumindest mit einem weiteren Faktor aus der Transkriptionsinitiation interagieren. Möglicherweise wäre es elegant, die inaktivierte Kinasedomäne mit als Interaktionspartner anzubieten, um den Stabilisierungseffekt durch die Inaktivierung der Kinase auszunutzen.

Auch die weitere Suche nach Substraten unter den Kofaktoren der Transkription erscheint sinnvoll. Zwar ist die T11-Phosphorylierung von H3 eine überraschende Entdeckung im Bezug auf den Histoncode, dennoch ist nicht gesagt, dass die Histonphosphorylierung die einzige ist, die von der Kinase im Rahmen der Transkription ausgeführt wird. So wären beispielsweise die Mitglieder der SRC-Familie interessant, an deren multiplen Phosphorylierungsstellen verschiedene Signalwege zusammen zulaufen scheinen (Übersicht in: Wu *et al*, 2004). Gerade SRC-3 könnte als Interaktionspartner von Pin1 (Yin *et al*, 2005) welches wiederum mit AATF assoziiert in die Nähe der ZIPK gelangen. Die funktionale Halbwertszeit von SRC-3 in der Transcription ist interessanterweise über phosphorylierungs-abhängige Ubiquitinierung reguliert (Wu *et al*, 2007).

Weiter könnte der Zeitpunkt, zu dem nach Zugabe des Hormons die ZIPK mit AATF und dem Androgenrezeptor zusammentrifft und dann am Promotor erscheint, enger eingegrenzt werden, um die zeitlichen Abläufe der Promotoraktivierung genauer zu verstehen. Es wäre

dabei wichtig zu analysieren, ob sich dieser Komplex erst am Promotor zusammensetzt, oder ob die Komponenten auch schon vor der Bindung an die DNA zusammen finden. Die frühen zyklischen Prozesse an glukokortikoid- und estrogen-rezeptorabhängigen Promotoren konnten sehr exakt und quantitativ beschrieben werden (Nagaich *et al*, 2004; Metivier *et al*, 2003; Reid *et al*, 2003). Hierbei wurde nach Hormonentzug die plötzliche Verabreichung des Hormons verbunden mit einem  $\alpha$ -Amanitinblock durchgeführt (Nagaich *et al*, 2004, Mellor, 2006). Dieser Wirkstoff blockiert die RNA-Polymerasen und macht es technisch einfacher die Transkription im Zellkulturmaßstab punktgenau zu synchronisieren.

Der Glukokortikoidrezeptor wird auch von der ZIPK unterstützt (Leister, Diplomarbeit 2003), während im Zusammenhang mit dem Estrogenrezeptor kaum ein Effekt zu messen war. Es wäre wichtig zu untersuchen, ob die ZIPK ein genereller Koaktivator von Steroidrezeptoren ist, oder nur in Zusammenarbeit mit einzelnen Rezeptoren agiert.

Auch langfristige Untersuchungen (4, 8 und 16 Stunden) sind interessant, denn in dieser Arbeit wurden nur die ersten 2 Stunden nach Induktion intensiver untersucht, während die androgenabhängige Transkriptionsaktivität noch bis zu 16 Stunden nach der Induktion weiter ansteigt (Wang *et al*, 2005). Auch wenn für den Androgenrezeptor keine zyklische Promotoraktivierung wie für Estrogen- und Glukokortikoidrezeptor gezeigt werden konnte, ist dadurch nicht bewiesen, dass ein einzelner Rezeptor dabei über mehrere Stunden am Promotor verweilt, was zu unserer Vorstellung über die Funktion von TSG101 passen könnte, oder ob auch hier ein dynamischer Wechsel der Promotorkomplexbildung vorliegt, der jedoch nicht regelmäßig genug ist, um mit der Methode der Chromatin-Immunpräzipitation gemessen zu werden.

Die Funktion der ZIPK in der Transkription beginnt sich gerade erst abzuzeichnen und ist weiterhin ein sehr vielversprechendes Forschungsfeld, das in verschiedenen Richtungen weiter bearbeitet werden sollte.

## Zusammenfassung

Die ZIPK wurde als Interaktionspartner von diversen Transkriptionsfaktoren identifiziert. Veröffentlichungen über die Funktion der ZIPK beschränken sich auf ihre Funktionen in der Apoptose, Mitose und der Reorganisation des Cytoskeletts. Einen Einfluss der Kinase auf die Regulation der Transkription konnte kürzlich erstmals in Verbindung mit STAT3 gezeigt werden (Sato *et al*, 2005). Da die ZIPK mit AATF und Par-4 über Interaktionspartner verfügt, die speziell als Koaktivatoren des Androgenrezeptors fungieren, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch die Kinase eine Funktion in der androgenabhängigen Transkription ausübt.

Die ZIPK zeigt in transienten Reporterexperimenten den Effekt eines Koaktivators des Androgenrezeptors. Dieser Koaktivatoreffekt war auch mit p53 messbar und konnte in verschiedenen Zelllinien verifiziert werden. Sie kooperiert dabei mit AATF, welcher bereits als Koaktivator in der steroidrezeptorabhängigen Transkription sowie bei E2F und p53 beschrieben ist.

Es konnte zwar *in vitro* keine direkte Interaktion nachgewiesen werden, jedoch wurde anhand der Koimmunpräzipitation gezeigt, dass es *in vivo* eine Bindung von ZIPK und Androgenrezeptor gibt, denn sie lassen sich hormonabhängig im gemeinsamen Komplex aufreinigen. Die Kartierung der Interaktionsdomäne seitens der ZIPK ergab, dass zwei unabhängige Bereiche der C-terminalen Domäne der ZIPK für die Interaktion verantwortlich sind. Einerseits kann sie indirekt mit ihrem Leucinzipper über AATF als Adapter an den Rezeptor binden, und andererseits genügt noch der Bereich 275-333 um die Kinase zu rekrutieren.

Die Kinaseaktivität ist für den Koaktivatoreffekt essentiell und bestimmt auch die Anordnung der Kinase in den „Speckles“. Während die inaktive Mutante zwar stabiler mit dem Rezeptor assoziiert, besitzt sie aber keinen Einfluss mehr auf die Transkriptionseffektivität der androgenabhängigen Promotoren.

Weiter konnte gezeigt werden, dass die endogene ZIPK in hormonabhängiger Weise gemeinsam mit dem Rezeptor und mit AATF an die Promotoren und Enhancer endogener Zielgene gebunden ist. Da sich die ZIPK schon sehr früh, etwa 30 Minuten nach der hormonellen Induktion mit dem Androgenrezeptor zusammen lagert, ist zu vermuten, dass sie mit ihrer Kinaseaktivität zu den Prozessen der initialen Promotoraktivierung und der Entwicklung des Initiationskomplexes beiträgt. Folgerichtig konnte mittels siRNA-Reduktion der ZIPK-Expression gezeigt werden, dass die Promotoreffektivität drastisch sinkt.

Die soweit gesammelten Daten charakterisieren die ZIPK als Koaktivator der androgenabhängigen Transkription. Offen ist, ob der Mechanismus ihrer Koaktivierung auf ihrer Funktion als Histonkinase mit der Phosphorylierung von Histon H3 an Threonin 11 beruht.



## 4. Material

### 4.1. Chemikalien und Enzyme

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in Analyse-Qualität von den Firmen *Biorad* (Schwalbach); *Merck* (Darmstadt); *Roche Molecular Biochemicals* (Mannheim); *Roth* (Karlsruhe); *Sigma* (Taufkirchen) und *USB* (Bad Homburg) bezogen.

Radiochemikalien ( $[^{35}\text{S}]$ -Methionin) stammten von der Firma *Amersham-Pharmacia Biotech* (Freiburg), Enzyme von den Firmen *Biolabs* (Schwalbach); *Invitrogen* (Karlsruhe); *Promega* (Mannheim) und *Roche Molecular Biochemicals* (Mannheim).

### 4.2. Allgemeine Stammlösungen und Puffer

<b>PBS<sup>+</sup></b>	1,15 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	0,2 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
	8 g/l	$\text{NaCl}$
	0,2 g/l	$\text{KCl}$
	0,1 g/l	$\text{CaCl}_2$
	0,1 g/l	$\text{MgCl}_2$
	pH 7,2	
<b>PBS<sup>-</sup></b>	wie PBS <sup>+</sup> , aber <u>ohne</u> $\text{CaCl}_2$ und $\text{MgCl}_2$	

#### 4.2.1 Lösungen für DNA-Analysen

##### 6x Ladepuffer (für Gelelektrophorese)

0,15 %	Bromphenolblau
0,15 %	Xylencyanolblau
15 %	Ficoll 400
30 %	Glyzerin
50 mM	EDTA

<b>TAE Puffer (50x)</b>	2 M	Tris
	1 M	NaAc
	50 mM	EDTA
	pH 7,9 mit Essigsäure (96%) eingestellt	

<b>TBE Puffer (10x)</b>	1 M	Tris
	0,83 M	Borsäure
	10 mM	EDTA

<b>TE Puffer</b>	10 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	1 mM	EDTA

Die Lösungen wurden in aqua bidest angesetzt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Als Längenstandard bei der DNA-Auftrennung im Agarosegel wurden die *peqGOLD* 100bp DNA-Leiter und die *peqGOLD* 1kb DNA-Leiter von *peqLab* verwendet.

#### 4.2.2 Lösungen für die Aufreinigung und Auftrennung von Proteinen

<b>Probenpuffer (2x)</b>	250 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	40 mM	DTT
	6,6 %	SDS
<b>NEM</b>	25 mg	NEM
	0,66 ml	H <sub>2</sub> O
	0,33 ml	Glyzerin, gesättigt mit BPB
<b>Phosphatlysispuffer (PLP)</b>	20 mM	NaPO <sub>4</sub> , pH 8
	140 mM	NaCl
	3 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5%	NP-40
	1 mM	DTT
	50 µM	Leupeptin
	<b>Buffer J</b>	10 mM
	140 mM	NaCl
	1%	DOC
	1%	NP-40
	0,1%	SDS
	1 mM	DTT
	1 µg/ml	Aprotinin

Die Lösungen und Puffer können bei -20°C gelagert werden.

### 4.3. Medien

#### 4.3.1. Medien für Bakterienkultur

<b>LB-Medium</b>	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Bacto Yeast Extract
	5 g	NaCl
	add 1 l	H <sub>2</sub> O
	pH 7,5	
<b>LB-Agar</b>	32 g	LB-Agar
	add 1l	H <sub>2</sub> O
	pH 7,5	
	→ giessen: 25 ml/Petrischale	
<b>dYT-Medium</b>	5 g	NaCl
	10 g	Bacto Yeast Extract
	16 g	Trypton
	add 1 l	H <sub>2</sub> O
<b>YB-Medium</b>	98 ml	dYT-Medium (autoklaviert)
	+ 1 ml	1 M KCl (autoklaviert)
	+ 1 ml	2 M Mg SO <sub>4</sub> (autoklaviert)

Die Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert und bei 4°C gelagert. Gegebenenfalls wird vor Gebrauch das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

**Ampicilin** 100 µg/ml Endkonzentration (Stammlsg: 50 mg/ml H<sub>2</sub>O Factor: 1/500)

**Kanamycin** 50 µg/ml Endkonzentration (Stammlsg: 10 mg/ml H<sub>2</sub>O Factor: 1/200)

#### 4.3.2 Medien für die Kultur von Säugerzellen

<b>DMEM und RPMI</b>	Fertigmedien von <i>Sigma</i> komplimentiert mit 5 oder 10 % fötalem Kälberserum (FCS) ( <i>Biochrom AG</i> ; Berlin) 1% Pen/Strep (100x) s.u.
<b>RPMI (R-7509)</b>	Farbstoffreies Medium (ohne Phenolrot), für versuche mit Steroidrezeptoren

**FCS** Fötale Kälberserum (Biochrom, FBS Superior, Standardisiert S6015)  
Aktivkohle behandeltes FCS wurde von Dr. Metzger (Medizinisches Forschungszentrum Freiburg) zur Verfügung gestellt, und von PAN Biotech (P30-2301) verwendet.

**DHT** Dihydrotestosteron (Sigma, D5027)

#### 4.4. Bakterienstämme und Zelllinien

##### 4.4.1. Bakterienstämme

Bei allen Stämmen handelt es sich um *Escherichia coli*.

**DH5 $\alpha$**  F<sup>-</sup>, *hsdR17* (rk<sup>-</sup>, mk<sup>-</sup>), *lambda*<sup>-</sup>, *supE44*, *endA1*, *thi1*, *gyrA96.relA1*; Hanahan (1983);

**M 15** *K12-Mutante mit  $\Delta$ (pro-lac)thi, F80d, ara-rpsL, (str<sup>r</sup>), lacZdel*; Villarejo & Zabin (1974)

##### 4.4.2. Zelllinien

**HEK 293** Humane ebryonale Nierenzellen

**Lncap** Humane Prostatakarzinomzellen, androgenabhängig

**PC3** Humane Prostatakarzinomzellen, androgenabhängig

**Rat1** Immortale Rattenfibroblastenzellen mit normalem Phänotyp

**MCF7** Menschliche Brust Adenokarzinom Zelllinie

**HeLa** Menschliche Zevix-Karzinom Zellen

## 4.5. Plasmide

<b>pCMV-Tag-2b</b>	Eukaryontischer Expressionsvektor, mit Kanamycin-Resistenzgen, T3 und T7 Promotor, 5' des Polylinkers befindet sich die kodierende Sequenz für das Flag-Epitop: MDYKDDDDK. Hierfür sind spezielle $\alpha$ -Flag-Antikörper zuzukaufen.
<b>pEGFP-C1</b>	Eukaryotischer Expressionsvektor, 3' des Polylinkers befindet sich das Gen für das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP), außerdem: ein Kanamycin-Resistenzgen, dem GFP-Gen ist ein CMV-Promotor vorangeschaltet.
<b>pGEX-6T</b>	Bakterieller Expressionsvektor mit Ampicillin-Resistenzgen, 5' des Polylinkers befindet sich das Gen für Glutathion-S-Transferase.
<b>pGL3</b>	Luciferase Reportervektor zum Einbau von Promotorelementen.
<b>p21-Luc</b>	Luciferase Reportervektor mit dem proximalen Promotor des p21-Gen.
<b>SV40- /CMV-Luc</b>	Luciferase Reportervektor mit viralen Testpromotoren.
<b>MMTV-Luc</b>	Reporterkonstrukt, mit „Firefly“-Luciferasegen unter Kontrolle des MMTV-Promotors, und Ampicillin Resistenz.
<b>ERE-Luc</b>	Reporterkonstrukt mit „Firefly“-Luciferase hinter TK-Promotor und vorgeschaltetem doppeltem Estrogenresponselement, und Ampicillin Resistenz.
<b>SV-ER</b>	Estrogenrezeptor-cDNA-Sequenz unter Kontrolle des SV40-Promotors und Ampicillinresistenz. (ERE-Luc und SV-ER wurden zur Verfügung gestellt von F. Gannon und S. Denger, Heidelberg.)

## 4.6. Deletions- und Mutageneseonstrukte

AATF-Konstrukte und Mutanten wurden beschrieben in Leister (Diplomarbeit, 2003) und Burgdorf (Dissertation, 2004). ZIPK-Mutanten wie zuvor beschrieben in Imam Chasan, Diplomarbeit (2007) und den darin aufgeführten Referenzen. AR-Konstrukt wurde beschrieben in in Leister (Diplomarbeit, 2003) und Burgdorf (Dissertation, 2004).

## 4.7. Oligonukleotidprimer

### 4.7.1. Primer für die Klonierung des PSA Promotors in den pGL3-Vektor

Forward: 5'-cggtaggacattggttgcacg-3'

Reverse: 5'-gctaggctctccgggtgcaggtg-3'

### 4.7.2. Primer für die Chromatin-Immunpräzipitation

PSA Promotor (121-459)

Forward: 5'-cccacacccagagctgtggaagg-3'

Reverse: 5'-gccaagacatctatttcaggagc-3'

PSA Enhancer (3922-4288)

Forward: 5'-gggaggcaattctccatgatt -3'

Reverse: 5'-ggggtttgtgccactggtgag-3'

## 4.8. Antikörper

- |  |  |
|--|--|
| <b>Maus <math>\alpha</math> Flag</b>   | Monoklonaler Antikörper (Klon 12CA5) aus Maus, spezifisch gegen das Flag-Epitop des pCMV-Tag-Vektors. ( <i>Jackson Immuno Research</i> ) Oder von Sigma (F3165). |
| <b>Rabbit <math>\alpha</math> AR</b>   | Polyklonaler Antikörper gegen Androgenrezeptor. ( <i>Santa Cruz Biotech</i> , H-280)   |
| <b>Mouse <math>\alpha</math> AR</b>    | monoklonaler Antikörper gegen Amdrogenrezeptor. BD Pharmingen (5547225)  |
| <b>Rabbit <math>\alpha</math> ZIPK</b> | polyklonale Antikörper gegen ZIPK von Clontech (691700) oder Serotech (AHP-490).   |
| <b>Rabbit <math>\alpha</math> GFP</b>  | Polyklonaler Antikörper gegen eGFP von Living Colores, Clontech (6248540)  |

---

<b>Rabbit IgG</b>	Unspezifische Antikörper als Negativkontrolle bei Immunpräzipitationen ( <i>Santa Cruz Biotech</i> , G-302)
<b>Rabbit <math>\alpha</math> AATF</b>	Polyklonaler antikörper gegen AATF, freundlichst zur Verfügung gestellt von M. Fanciulli ), Italien.
<b>Ziege <math>\alpha</math> Maus-Cy3</b>	Sekundärer Antikörper aus Ziege, der die konstante Region von Immunglobulinen der Maus erkennt, gekoppelt an Cy <sup>TM</sup> 3. ( <i>Jackson Immuno Research</i> )
<b>Goat <math>\alpha</math> Rabbit PO</b>	Peroxidase gekoppelter Antikörper zur Detektion des Primärantikörpers im Western Blot (Nordic Immunology, 6105)
<b>Rabbit <math>\alpha</math> Mouse PO</b>	Peroxidase gekoppelter Antikörper zur Detektion des Primärantikörpers im Western Blot (Nordic Immunology, 5541).

## **5. Methoden**

### **5.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden**

#### **5.1.1. Restriktionsverdau**

Für den Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA werden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet. Diese erkennen kurze palindromische Sequenzen und katalysieren die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung in jedem Strang innerhalb ihrer Erkennungssequenz. Auf diese Weise entstehen Fragmente mit glatten Enden oder mit 5'- oder 3'- Überhang. Der Restriktionsverdau erfolgt in der Regel mit 1 u Enzym/ $\mu$ g DNA bei 37°C für 1-2h.

Manche Restriktionsenzyme, so wie *ScaI*, können nach dem Schneiden an der DNA hängen bleiben, was zu Problemen bei einer anschließenden Ligation führen kann.

In diesem Fall muss das geschnittene Fragment folgendermaßen nachbearbeitet werden:

Nach dem Restriktionsverdau werden dem Reaktionsansatz 50 mM EDTA und 1% SDS zugegeben. Danach wird der Reaktionsansatz für 20 Minuten bei 80°C inkubiert, was zur Dissoziation und Denaturierung des Enzyms führt.

Abschließend muss das Fragment noch aufgereinigt werden mittels präparativer Agarosegel-Elektrophorese DNA-Aufreinigungssatz (Nucleospin Extract II Nr. 740609.50, Macherey und Nagel, Düren oder Jetquick PCR-Purification SpinKit, Genomed, Löhne).

#### **5.1.2. Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Zur Verhinderung ungewollter Religation des Vektors, muß linearisierte Vektor-DNA dephosphoryliert werden. Mit Hilfe der antarktischen Phosphatase (NEB, M0289S) werden die Phosphatgruppen der 5'-Enden (gegebenenfalls 3'-Enden) abgespalten. Die Reaktion wird mit 1 u Enzym/ $\mu$ g DNA für 20 min bei 37°C (10 min bei 3' –Enden) durchgeführt.

Abgestoppt wird die Phosphatasereaktion durch Zugabe von 5 mM EGTA und 5 min Hitzeinaktivierung bei 65°C. Vor einer Klonierung muß die Vektor-DNA noch durch präparative Agarosegel-Elektrophorese oder Aufreinigungssatz aufgereinigt werden.

#### **5.1.3. Agarosegel-Elektrophorese**

Da DNA eine negative Ladung besitzt, kann sie in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe zwischen 100 bp und 20000 bp verwendet man 1% Agarosegele. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid (0,5 g/ml) zugegeben. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen zwei benachbarte Basenpaare der DNA und wird mit Hilfe eines UV-



Transilluminators angeregt. Die Elektrophorese erfolgt mit 75V für ungefähr 1 h in 1x TAE-Puffer.

#### **5.1.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Jetsorb-Kits (*Genomed*). Mit dieser Methode können DNA-Fragmente zwischen 200 und 1000 bp aufgereinigt werden.

Die gewünschten DNA-Fragmente werden unter einer 302 nm UV-Lampe aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß gegeben und gemäß Kit-Herstellerangaben behandelt und gereinigt. Die aufgereinigte DNA kann nun für Klonierungen verwendet werden.

#### **5.1.5. Phenol:Chloroformreinigung**

Zu einer DNA-haltigen Lösung wird das gleiche Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol<sup>1</sup> (im Verhältnis 25:24:1) zugegeben, das Gemisch „gevortext“ und anschließend 2 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Zur besseren Handhabung sollten kleine Volumina auf mindestens 100 µl aufgefüllt werden.

Die Trennung des DNA-haltigen Überstandes erfolgt aufgrund des unterschiedlichen Lösungsverhaltens von DNA und Proteinen. Die Proteine, die sich zunächst in der polaren, wässrigen Phase befinden, kommen bei der Durchmischung mit dem apolaren Phenol in Berührung. Bei der anschließenden Zentrifugation trennen sich die wässrige und phenolische Phase wieder. Da die hydrophoben Seitenketten aliphatischer Aminosäuren bestrebt sind, den Kontakt zur apolaren Phase zu halten, sammelt sich ein Großteil der Proteinverunreinigungen an der Interphase, der Grenzfläche zwischen Wasser und Phenol. Dagegen verbleibt die hydrophile DNA weiter in der wässrigen Phase und kann so weitgehend von Proteinverunreinigungen befreit werden. Dazu wird die wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Um abschließend die in der wässrigen Phase verbliebenen restlichen Phenolanteile zu entfernen, wird nochmals das einfache Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (Tris-gesättigt) zugesetzt. Nach erneutem Mischen und Zentrifugation sollte der Großteil des restlichen Phenols in der unteren, apolaren Phase vorliegen. Die obere Phase wird wieder in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2,5 Vol kaltem EtOH abs. und 1/10 Vol 3 M NaAc, pH 5.2, 20 min bei -70°C gefällt (Alternativ: >2h bei -20°C).

Nach der Fällung wird das Reaktionsgefäß für 30 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA Pellet mit 70% EtOH gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 15 min bei 4°C und 14.000 rpm wird der Überstand erneut verworfen, das Pellet getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

### 5.1.6. Ligation

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Veresterung einer endständigen 5'-Phosphorylgruppe mit einer endständigen 3'-Hydroxylgruppe, auf diese Weise werden DNA-Enden kovalent miteinander verknüpft. Diese Technik erlaubt den Einbau von DNA-Fragmenten in Plasmide: Das zu inserierende DNA-Fragment sollte in einem molaren Mengenverhältnis von 3:1 bis 6:1 zur Vektor-DNA vorliegen. Die Reaktion erfolgt in einem Gesamtvolumen von maximal 20 µl mit 1 u T4-Ligase bei 16°C üN (bei cohäsiven Enden: 2 h bei RT). Der Ligationsansatz steht nun für eine Transformation zur Verfügung.

### 5.1.7. Herstellung kompetenter Bakterien

Benötigte Lösungen:

<b>TFB I-Puffer</b>	30 mM	NaAc
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>
	100 mM	NaCl
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	pH 6,0	steril filtriert
<b>TFB II-Puffer</b>	10 mM	Mops
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	NaCl
	15 %	Glyzerin
	pH 7,0	steril filtriert

200 ml YB-Medium werden aus einer Übernachtskultur 1/100 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,45-0,55 bei 37°C kultiviert. Bei dieser OD befinden sich die Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase. Die Bakteriensuspension wird 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 10 min bei 4°C mit 2.500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 1/5 des Ausgangsvolumens (40 ml) TFB I-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation mit 3.000 rpm für 10 min bei 4°C werden die Bakterien in 1/25 des Ausgangsvolumens (8 ml) TFBII-Puffer (eiskalt) resuspendiert und in 100 µl Aliquots im EtOH-Trockeneisbad schockgefroren. Die kompetenten Bakterien werden bei -70°C gelagert.

### 5.1.8. Transformation

Kompetente Bakterien (100 µl) werden auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA (1 µg) vermischt. Nach Inkubation von 30 min auf Eis erfolgt der Hitzeschock von 2 min

bei 42°C. Die Bakteriensuspension wird danach sofort wieder für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend werden 900 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Diese Inkubationszeit ermöglicht es den Bakterien, das auf dem transformierten Plasmid liegende Antibiotikaresistenzgen zu exprimieren, so dass nun 100-200 µl des Transformationsansatzes auf entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert werden können.

Wird zur Transformation ein problematischer Ligationsansatz (z.B.: „blunt-end“-Ligationen) eingesetzt, können die Bakterien nach der Inkubation bei 37°C, für 5 min bei 2.000 rpm pelletiert und 900 µl Medium abgenommen. Das Pellet wird in den verbleibenden 100 µl resuspendiert und komplett ausgestrichen.

### 5.1.9. Analytische Plasmidisolierung (Mini-Präp)

Bei der Mini-Präparation erfolgt die DNA-Isolierung durch alkalische Lyse der Bakterienzellen. Benötigte Lösungen:

**Lösung 1**

50 mM	Glucose
10 mM	EDTA, pH 8,0
25 mM	Tris-HCl, pH 7,5
vor Gebrauch zugeben:	
4 mg/ml	Lysozym (optional)
100 µg/ml	RNase
bei 4°C lagern	

**Lösung 2**

direkt vor Gebrauch frisch ansetzen	
1 %	SDS
0,2 N	NaOH

**Lösung 3**

3 M	KAc, pH 5,5
-----	-------------

Eine Einzelkolonie wird in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und 16 h bei 37°C schüttelnd kultiviert. 1 ml dieser Übernachtskultur wird in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 sek bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und das Bakterienpellet in 150 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wird das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert. Die alkalischen Bedingungen führen zur Zelllyse und zur Denaturierung von DNA und Proteinen. Zugabe von 150 µl Lösung 3 und sofortiges Invertieren bewirkt eine Neutralisation der Lösung. Die Plasmid-DNA kann während der anschließenden 5 min Inkubation auf Eis renaturieren. Die denaturierten Proteine und die darin verharkte genomische DNA können

jetzt durch 10 min Zentrifugieren mit 14.000 rpm pelletiert werden, während die Plasmid-DNA im Überstand verbleibt. Der Überstand wird sorgfältig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das 2,5-Fache Volumen Ethanol abs. zugegeben um die DNA auszufällen. Optional kann die Fällung durch 30 min bei -20°C unterstützt werden. Anschließend wird die ausgefallene DNA 10 min bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert, bei 55°C getrocknet und anschließend in 30 µl TE-Puffer gelöst.

Alternativ kann die Minipräp auch mittels „Plasmid-Mini-Spin-kit“ (*Genomend*) erfolgen, wodurch eine höhere Reinheit der DNA erreicht wird. Hierbei werden die Plasmide nach der alkalischen Lyse mittels kleiner Ionenaustauschsäulen aufgereinigt. Durchführung gemäß Herstellerangaben.

#### **5.1.10. Präparative Plasmidisolierung (Midi-Präp)**

Die Midi-Präparation ermöglicht, im Vergleich zur Minipräp, eine Plasmidisolierung in größeren Konzentrationen und Mengen, aber vor allem von sehr guter Qualität.

Eine üN-Kultur von 25-50 ml mit entsprechendem Selektionsantibiotikum wird angeimpft und nach ca. 16 h für 10 min bei 4.500 rpm pelletiert. Es wird empfohlen die Bakterien anschließend einmal in PBS<sup>+</sup> zu waschen, um Mediumreste zu entfernen.

Midipräparationen wurden mittels „Jetstar Plasmid-Midi-Kit 50“ (*Genomed*) nach Herstellerangaben durchgeführt. Auch hier erfolgt die DNA-Isolierung durch alkalische Lyse, die mit einem Reinigungsschritt über eine Ionenaustauschsäule verbunden ist.

#### **5.1.11. Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Anhand einer photometrischen Messung können sowohl die Konzentration, als auch die Reinheit einer DNA-Lösung bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm.

Der Absorbtionswert  $A_{260}$  einer DNA-Lösung von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 50 µg DNA/ml Lösung. Hieraus ergibt sich die Kurzformel: gemessener Absorbtionswert  $A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$ .

Anhand des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  wird der Reinheitsgrad einer DNA-Lösung bestimmt. Bei einer reinen DNA-Lösung liegt der Quotient bei 2. Durch Proteinverunreinigungen sinkt der Quotient.

### 5.1.12. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik wurde in dieser Arbeit genutzt zur Klonierung von Deletionsmutanten, und zur semiquantitativen Auswertung von Chromatin-Immunpräzipitationen. Weiterhin kann PCR-Technik für die ortsspezifische Mutagenese eingesetzt werden.

Als Primer für die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten werden synthetische Oligonukleotide eingesetzt, die über einen Bereich von 16-24 Basen zu den 5'-bzw. 3'-Enden der zu amplifizierenden DNA homolog sind. Die Oligonukleotide sollten einen GC-Gehalt von mindestens 50 % aufweisen. Ihre Hybridisierungstemperatur lässt sich, für Oligonukleotide mit ca. 18-22 Basen, vereinfacht nach folgender Formel bestimmen:

$$T_H = [(A/T \times 2) + (G/C \times 4)] - 3$$

Die Hybridisierungstemperatur eines Primers sollte zwischen 50°C und 60°C liegen, vor allem aber sollte ein Primer-Paar sich möglichst wenig in seinen Hybridisierungstemperaturen unterscheiden. Einige der eingesetzten Oligonukleotide enthielten an ihrem 5'-Ende noch Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die die nachfolgende Klonierung der PCR-Produkte erleichterten und eine gerichtete Klonierung erlaubten.

In dieser Arbeit kamen verschiedene Polymerasen zum Einsatz:

Die Taq-Polymerase (*Gibco BRL*) stammt aus dem Mikroorganismus *Thermophilus aquaticus* und ist sehr hitzestabil. Sie ist die einfachste, und günstigste Polymerase. Sie besitzt aber nicht die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Pwo-Polymerase (*Peqlab*), die deren Fehlerhäufigkeit im Vergleich zur Taq-Polymerase um den Faktor 5 verringert. Andererseits verfügt die „Pwo“ über keine terminale Transferaseaktivität und erzeugt daher stumpfe DNA-Enden. Zur Amplifikation besonders großer Fragmente wurde der „Expanded-Long-Template“-Polymerasemix von *Roche* verwendet, der speziell für größere PCR-Produkte (>1.5 kb) ausgelegt ist.

Die Spezifität und Effizienz einer PCR sind von vielen verschiedenen Parametern wie der Magnesiumkonzentration oder der Hybridisierungstemperatur abhängig, die für jedes Primer-Paar neu bestimmt werden müssen. Als Richtwert kann aber folgender Standardansatz genommen werden:

<b>PCR-Ansatz</b> (100 µl):	1 ng	Matrizen-DNA (Template) (2,5µl cDNA)
	50 pmol	je Primer
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	2,5 mM	je dNTP
	1x	PCR-Puffer
	0,5-2 u	Polymerase
	add 100 µl	H <sub>2</sub> O (mit 100 µl Parafinöl überschichten)

**PCR-Programm** (Mit  $T_H$  = Hybridisierungstemperatur):

10 Zyklen	[	94°C	4 min	DNA-Denaturierung
		94°C	1 min	DNA-Denaturierung
		$T_H$ °C	1 min	Primer-Anlagerung
		72°C	1 min/kb	Elongation (für Taq-Polymerase)
20 Zyklen	[	94°C	1 min	DNA-Denaturierung
		$T_H$ °C	1 min	Primer-Anlagerung
		72°C	1 min/kb	Elongation + 20 sek/Zyklus
		72°C	10 min	Abschlußelongation
		4°C	10 min	

Abschließend wird das Produkt mittels präparativer Agarosegel-Elektrophorese DNA-Aufreinigungssatz (Nucleospin Extract II Nr. 740609.50, Macherey und Nagel, Düren oder Jetquick PCR-Purification Spinkit, Genomed, Löhne) aufgereinigt.

Die semiquantitative PCR wurde standardisiert durchgeführt um eine hohe Vergleichbarkeit der Bandenstärken zu ermöglichen. Der Standardansatz für eine semiquantitative PCR setzt sich wie folgt zusammen:

<b>PCR-Ansatz</b> (20 µl):	4 µl	5x Puffer (Promega)
	2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	2 µl	dNTP (jeweils 2,5 µM)
	2 µl	Primer (jeweils 50 pM)
	0,5 -2 µl	Eluat der Chromatin-IP
	0,1 µl	GoTaq DNA-Polymerase (Promega)
	Add 20 µl	ddH <sub>2</sub> O

Das standardisierte Programm wurde nur im Bezug auf die Anlagerungstemperatur  $T_H$  und die Zyklenzahl der jeweiligen Situation angepasst.

95 °C	5 min		
95 °C	45 sek	}	30 bis 45 Zyklen
$T_H$	1 min		
72 °C	1 min		
72 °C	7 min		

Abschließend wurde von jedem Ansatz 10  $\mu$ l in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, und die relative Bandenstärke verglichen.

## 5.2. Proteinchemische Techniken

### 5.2.1. Immunpräzipitation (IP)

Die Zellen wurden in hormonfreiem Medium gehalten und für die jeweils angegebene Zeitspanne mit 10 nM DHT induziert. Für Präzipitationen von ektopisch expremierten Proteinen genügt dabei eine 10 cm Kulturschale mit 90 % Konfluens, für Experimente mit endogenen Proteinen wurde die fünffache Menge an Zellen eingesetzt.

Die Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen, und in Phosphatlysispuffer (PLP) lysiert. Das Chromatin der Lysate wurden mittels Benzonase für 10 bis 15 min auf Eis verdaut und die Proben dann durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min von unlöslichen Zellresten befreit.

Die Lysate wurden mit dem jeweiligen Antikörper versehen, und für 2 bis 4 h bei 4 °C auf dem Rollinkubator inkubiert. Die Präzipitation der Antikörpergebundenen Proteine erfolgte mittels Protein A oder Protein G-gekoppelter Sepharose. Davon wurden 20 bis 30  $\mu$ l zu gesetzt und die Proben für eine weitere Stunde bei 4 °C im Rollinkubator belassen.

Die Sepharose wurde mittels sanfter Zentrifugation sedimentiert, und der Überstand entfernt. Die Sepharose wurde dreimal gewaschen: Bei der Aufreinigung einzelner Proteine wurde mit Puffer J und zweimal mit einem Gemisch aus PLP und Puffer J im Verhältnis 5/1 gewaschen, während bei der Isolierung von Proteinkomplexen (Koimmunpräzipitation) einmal mit dem 5/1-Gemisch gewaschen wurde und zweimal mit PLP.

Die gereinigten Proteine wurden mittels Probenpuffer und kochen für 1 min eluiert, und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte dann mittels Antikörper im Western Blot.

Der Abgleich erfolgte Mittels Bradford oder optisch durch Peauseaufärbung der Blotmembran.

### 5.2.2. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Diese Methode dient dem Nachweis von DNA-gebundenen Proteinkomplexen, wie sie in der Promotoraktivierung eine Rolle spielen. Dazu wurden in dieser Arbeit LNCaP-Zellen verwendet, die bei 80 bis 90 % Konfluens für mindestens 48 h in farbstoff- und hormonfreiem medium gehalten. Sie werden dann für 30 bis 120 min mit 10 nM DHT induziert.

Die Zellen werden dann mit PBS (37 °C) gewaschen und für 10 min mit 1 % PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Dann werden die Zellen erneut zweifach mit PBS, diesmal eisgekühlt und mittels Gummischaber von der Kulturschale gelöst. Zellen wurden kurz in IP-Puffer (Nelson et al, 2006) gewaschen (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton x-100, 0,5 % NP40, 50 mM Tris-HCL, pH8, 0,5 mM DTT und 1x „Compleat Protease Inhibitoren Mix“ (Roche)), um Membranen und noch lösliche Proteine zu entfernen, und bei 2.000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Die Sedimente werden dann in 300 µl IP-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde das Chromatin durch Ultraschall zerkleinert, in Fragmente von 0,5 bis 2 kb länge. Es wurde ermittelt, das dazu 8 Stöße von jeweils 10 sek bei 40 % Leistung mit der Micotipp des „Branson sonicators (New Brunswick, NJ) nötig sind. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation bei 14.000 rpm bei 4 °C sedimentiert. Der DNA-Gehalt wird bestimmt, und pro Immunpräzipitation 100 bis 200 µg Chromatin eingesetzt. Dieses wird mit IP-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 800 µl gebracht, und 0,5 -1,5 µg des jeweilige Antikörpers zugesetzt.

Die Proben wurden bei 4 °C im Rollinkubator über Nacht inkubiert. Nach der Zugabe von 30 µl Protein-A-Sepharose wurde das Gemisch für eine weitere Stunde inkubiert.

Die Proben wurden dann successive gewaschen mit TSE1 (1 % Triton x-100, 0,1 % SDS, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL, pH 8), TSE2 (1 % Triton x-100, 0,1 % SDS, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL, pH 8), Puffer III (250 mM LiCl, 1 % NP40, 1 % Deoxycholat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL, ph 8) und dreimal in TE-Puffer.

Die Gewaschenen Komplexe können dann in 100 µl Chelex100 (10 % Suspension) druch 12 min kochten eluiert werden. Die Hitze zufur löst dabei auch die PFA-Fixierung wieder auf. Die Spharose wird mit dem Chelex sedimentiert durch Zentrifugation entfernt.

Für eine zweite Präzipitatiopnsrunde (ReChIP) werden die Proteinkomplexe mittels 10 mM DTT bei 37 °C im Schüttler von den Antikörpern eluiert. Der Überstand wird 1/50 in Verdünnungspuffer (1 % Triton x-100, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCL, pH 8) verdünnt, und kann dann für eine zweite Immunpräzipitation eingesetzt werden.



Die relativen Mengen an präzipitierter DNA können dann mittels semiquantitativer PCR verglichen werden.

### 5.2.3. Expression GST-Fusionsproteinen in Bakterien

Der Escherischia Coli-Expressionsstamm M15 wird mit dem jeweiligen Expressionsvektor (pGEX-Konstrukt) transformiert, und eine üN-Vorkultur (mit Ampicilin) angeimpft. Aus der Vorkultur wird eine 100 ml Expressionskultur 1/100 angeimpft diese wird bis zu einer  $OD_{\lambda=600} = 0,6$  schüttelnd bei 37°C kultiviert, und dann mit 1mM IPTG induziert. Nach weiteren 2,5 - 3 h werden die Bakterien geerntet: Die Kultur wird in 1 ml Aliquots 1 min bei 14.000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet einmal in PBS<sup>+</sup> gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Die Baktrienpellets können bei -70°C gelagert werden.

### 5.2.4. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Der pGEX-6T Vektor erlaubt die Expression von Fusionsproteinen mit der Glutathion-S-Transferase. Diese bindet sehr stark und spezifisch an Glutathion. Dieses Prinzip wird genutzt, um das exprimierte Fusionsprotein aus dem Lysat der aufgeschlossenen Bakterien aufzureinigen.

Aufschluss und Aufreinigung erfolgen in modifiziertem PBS<sup>+</sup>:

PBS <sup>+</sup>	+ 1 mM	DTT
	+ 1 mM	EDTA
	+ 25 µg/ml	Leupeptin
	+ 1 µg/ml	Aprotinin
Frisch dazugeben:	+ 1 mM	PMSF
	+ 0,5 mg/ml	Lysozym

#### Aufreinigung:

Das gewaschene Pellet aus 1 ml Expressionkultur wird in 100 µl des modifizierten PBS<sup>+</sup> resuspendiert und 30 min auf Eis gehalten.

Dann wird zugegeben:

1%	Triton x-100
2 mM	MgCl
2u	DNase

→ weitere 30 min auf Eis  
 → Abzentrifugieren 14.000 rpm 5 min

Sofern sich das exprimierte Protein (z.B. GST) jetzt im Überstand befindet, kann die Pelletfraktion verworfen werden. Der Überstand kann abgenommen werden, um weiter aufgereinigt zu werden. Dazu wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und 25 µl Glutathion-gekoppelte Sepharose zugegeben. Das Gemisch soll dann 1 h bei 4°C langsam rotieren. Anschließend wird die Sepharose 1 min bei 2.000 rpm sedimentiert und der Überstand abgenommen. Das an die Sepharose gekoppelte GST-Fusionsprotein wird abschließend 3x mit Phosphatlysispuffer oder Puffer J (höhere Stringenz) gewaschen.

Die Elution des Proteins kann nativ durch Zugabe von Gultathion erfolgen. Alternativ kann die Elution auch bei gleichzeitiger Denaturierung durch Zugabe von 30 µl 1x Probenpuffer und 5 min im Wasserbad bei 60°C erfolgen. Die Sepharose wird 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert, und der Überstand abgenommen. Mit 1/3 NEM versetzt, kann die Probe des GST-Fusionsproteins mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung dargestellt werden.

### 5.2.5. *In vitro* Transkription und Translation

Die *in vitro* Transkription/Translation erfolgt mit dem „TNT-T3/T7 Coupled Reticulocyte Lysate Kit“ der Firma *Promega* nach Angaben des Herstellers.

Die Matrizen-DNA wird in den pCMV-Tag-2b Vektor kloniert, der einen T7-sowie T3-Promotor enthält. Die angebotene DNA muss in gereinigter Form (Phenol/Chloroform extrahiert oder Midi-DNA) vorliegen. Für einen Ansatz werden maximal 2 µg DNA und die entsprechenden anderen Komponenten zusammengegeben und für 90 min bei 30°C inkubiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die produzierten Proteine durch Zugabe von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert.

Im Anschluss werden 20 µg RNase A und 1 µg Leupeptin zugesetzt und für 15 min bei RT inkubiert, um den radioaktiven Hintergrund, der durch [<sup>35</sup>S]-Methionin beladene t-RNA entsteht, zu reduzieren. Das radioaktiv markierte Protein kann nun für *in vitro* Protein-Protein-Bindungsnachweise verwendet werden.

### 5.2.6. *In vitro* Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde einer der beiden potentiellen Interaktionspartner, das C-terminale AATF-Fragment als GST-Fusionsprotein exprimiert und an Glutathion-Sepharose gebunden und gereinigt. Der potentielle Interaktionspartner wird *in vitro* synthetisiert und [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert.

Nun wird zu dem Sepharose-gebundenem Fusionsprotein 3 - 5 µl des radioaktiven *in vitro* Translationsansatzes gegeben, mit modifiziertem PBS<sup>+</sup> auf 200 µl aufgefüllt und für 16 h bei 4°C auf dem Rollinkubator inkubiert. Anschließend wird der Ansatz 3x mit PLP gewaschen.

Die Elution der Proteine erfolgt wie unter 3.2.2 durch Inkubation mit 1x Probenpuffer. Der Ansatz wird mit 1/3 Volumen NEM versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Protein-Protein-Interaktion kann dann durch Fluorographie gezeigt werden.

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit Steroidrezeptoren gearbeitet wurde, können zur Untersuchung der Hormonabhängigkeit die entsprechenden Hormone zugesetzt werden: Es wurden dieselben Konzentrationen wie bei den Zellkulturexperimenten (3.3.3) eingesetzt.

### 5.2.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient dem Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Denaturierung der Proteine erfolgt durch Anlagerung von SDS (Natriumdodecylsulfat). Das angelagerte negativ geladene Detergenz überlagert die Eigenladung der Proteine und ist proportional zu deren Masse.

Bei der diskontinuierlichen SDS-Page werden die Proteine zuerst in einem Sammelgel (pH 6,8) konzentriert, die eigentliche Auftrennung erfolgt dann im Trenngel (pH 8,8).

<b>Trenngel (10%)</b>	4 ml	Trenngelpuffer (1,5 M Tris; 0,4 % SDS; pH 8,8)
	6,7 ml	H <sub>2</sub> O
	5,3 ml	Acrylamidlösung (30%)
	80 µl	APS (10%)
	4 µl	TEMED
<b>Sammelgel</b>	1,25 ml	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris; 0,4 % SDS; pH 6,8)
	3 ml	H <sub>2</sub> O
	0,75 ml	Acrylamidlösung (30%)
	15 µl	APS (10%)
	5 µl	TEMED
<b>Elektrophoresepuffer</b>	0,192 M	Glycin
	25 mM	Tris
	3,5 mM	SDS

Die Proteinproben werden vor dem Auftragen mit gleichem Volumen an 2x Probenpuffer versetzt und für 3 min gekocht. Anschließend wird 1/3 Volumen NEM zugegeben.

Die Elektrophorese der Proteine durch das Sammelgel findet bei 17 mA statt, im Trenngel bei 34 mA. Die Elektrophorese wird beendet bevor die Bromphenolblaubande (Lauffront) das Gel verläßt. Je nach Versuchsansatz wird das Gel auf verschiedene Weise weiterbehandelt.

Der unspezifische Proteinnachweis erfolgt mit Hilfe einer Coomassie- oder Silberfärbung, der Nachweis erfolgt durch Autoradiographie oder Western Blot.

### 5.2.8. Coomassiefärbung

Die Coomassiefärbung eignet sich zum Anfärben relativ großer Proteinmengen auf einem PAA-Gel. Nach der Elektrophorese wird das Gel zunächst für 1 h in der Coomassie-Färbelösung gefärbt und dabei gleichzeitig fixiert. Anschließend erfolgt die Entfärbung 3x für 30 min, bis klare Proteinbanden sichtbar sind. Vor dem Trocknen muß das Gel noch 3x 10 min gewässert werden.

**Coomasielösung:** 0,1% Coomassie brilliant Blue in Fixierlösung

**Fixierlösung:** 25% Isopropanol  
10% Essigsäure

**Entfärber:** 10% Isopropanol  
10% Essigsäure

### 5.2.9. Western Blot

Die Übertragung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Blot-Membran (Macherey und Nagel, Porablot 0,45 µm, NCP-741281) erfolgte im Naß-Blot-Verfahren, in einer Blot-Kammer (Biorad) in Blot-Puffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin) bei 75 V und maximal 250 mA für zwei Stunden. Optional kann eine Ponceau-Färbung durchgeführt werden mit 1 % Ponceaulösung (Roth).

Die Blot-Membran wurde 2 h gegen unspezifisches Binden der Antikörper geblockt mit Blockierungslösung (5 % Magermilchpulver (Sucofin), 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,05 Tween). Die Antikörper wurden in der Regel 1:2000 (primärere Antikörper) und 1:10.000 (sekundärer Antikörper) in TBS/Tween (200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,05 Tween) eingesetzt. Der Erste Antikörper wird für 2 h auf dem Blot inkubiert (wippe). Der Blot wird zweimal gewaschen mit TBS/Tween, und der zweite Antikörper für 30 min inkubiert. Abschließend wird der Blot dreimal 10 min in TBS/Tween gewaschen.

Der fertige Blot wird abgetropft und mit dem Substrat der Peroxidase benetzt. Dazu dient das ECL Reagenz, das frisch angesetzt werden muß: 1 ml Lösung A (100 mM Tris-HCl, pH 8,6 und 250mg/l Luminol (Sigma, A4685)) wird mit 0,3 µl 35 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 100 µl Lösung B (11 mg Hydroxycoumarinsäure (Sigma, C9008) in 10 ml DMSO) vermischt und über den Blot gegeben. Die Detektion des Lichtsignals erfolgt mittels aufgelegten Röntgenfilms.

### 5.2.10. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgt mit dem Protein Assay der Firma *BioRad*. Hierzu werden 20 µl Zellextrakt (3.2.2) in 780 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 200 µl *Protein Assay Reagenz* gemischt. Nach einer Inkubation von 5-60 min bei RT erfolgt die Messung der Absorption bei  $\lambda = 595$ . Anhand einer zuvor erstellten Eichgraden können die Proteinkonzentrationen einzelner Proben bestimmt werden.

## 5.3. Zellkulturmethoden

### 5.3.1. Kultur von Säugerzellen

Die Arbeiten an lebenden eukaryotischen Zellen erfolgen unter einer Sterilbank. Die Kultivierung der Zellen erfolgt bei 37°C und 10% bzw. 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem Inkubator auf speziell beschichteten Zellkulturschalen.

Die REF52.2, und HeLa wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin und 10% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. RAT1- Zellen werden unter den gleichen Bedingungen mit 5% FCS gehalten. Die Kultivierung der MCF7-Zellen erfolgte in RPMI-1640 Medium mit 5% FCS und ebenfalls 1% Penicillin/Streptomycin und 5% CO<sub>2</sub> Konzentration.

Zur Passage wurden die Zellen generell zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mittels Trypsin vom Boden der Kulturschale gelöst. Dann können die Zellen in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:10 in frischem Medium aufgenommen und neu ausplattiert werden.

Für Versuche mit dem Estrogenrezeptor ist es notwendig, MCF7-Zellen in Farbstofffreiem Medium zu halten, da der normalerweise in Fertigmedien enthaltene Farbstoff Phenol-Rot wie Estrogen wirkt, und dessen Rezeptor aktiviert. Weiterhin müssen für diese Versuche Hormonreste aus dem eingesetzten FCS entfernt werden. Es wurde daher Aktivkohle behandeltes FCS eingesetzt. Dazu wird eine kleine Menge FCS (25 ml) auf pH 4 titriert und üN mit 5 g Aktivkohlegranulat bei 4°C gerührt, und anschließend wird die Kohle abzenrifugiert, und das FCS neutralisiert und sterilfiltriert.

### 5.3.2. Transfektion von Säugerzellen

Die Einschleusung von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Es wird zwischen einer transienten und einer stabilen Transfektion unterschieden:

Bei der stabilen Expression von Proteinen wird die Fremd-DNA in das Genom der Zelllinie integriert. So ist es möglich, den Einfluß des Fremd-Genes auf die Physiologie der Zelle längerfristig und, sofern ein induzierbares System verwendet wird, auch unter gesteuerter Expression zu studieren.

Dagegen wird bei der transienten Transfektion das Protein nur vorübergehend überexprimiert. Die Fremd-DNA wird bei einer transienten Transfektion nicht stabil ins zelluläre Genom aufgenommen. Das Gen wird direkt vom eingeführten Plasmid direkt exprimiert. Durch eine transiente Überexpression können unter geeigneten Bedingungen große Mengen des zu untersuchenden Proteins beobachtet und aufgereinigt werden.

Man kennt verschiedene Transfektionsverfahren wie Mikroinjektion, Elektroporation, Lipofektion oder auch Calcium-Phosphat-Kopräzipitate. Diese Verfahren unterscheiden sich wesentlich in ihrer Effizienz aber auch ihren Kosten. Vor und Nachteile einer Methode müssen daher gegeneinander abgewogen werden. Eine Transfektion bedeutet außerdem immer Stress für die Zellen. Jede Zelllinie reagiert unterschiedlich empfindlich auf die verschiedenen Methoden. Deshalb muss immer getestet werden, welche Methode für die jeweilige Zelllinie am verträglichsten ist.

Die überexprimierten Proteine können als „Flag“- oder GFP-markierte Proteine in den Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Desweiteren wurde das Prinzip der transienten Transfektion zur Untersuchung des Einflusses von AATF auf die Transaktivierung der Steroidrezeptoren im Luciferasereporter-Experiment verwendet.

Bei allen Transfektionsmethoden werden die zu transfizierenden Zellen am Vortag so passagiert, dass sie vor der Transfektion eine Konfluenz von ca. 30-50% aufweisen. Hierbei handelt es sich um einen Erfahrungswert, der zu einer hohen Transfektionseffizienz führt.

Es ist zu beachten, dass bei Luciferasereporter-Experimenten maximal 2,2 – 2,5 µg DNA pro SP eingesetzt werden sollten, da bei zu großen Gesamt-DNA-Mengen die Luciferaseaktivität absackt. Da es hierbei auch wichtig ist, dass die DNA-Gesamtmenge immer konstant bleibt, wurden die Mengen jeweils mit „leerem“ pCMV-Tag-2b ausgeglichen.

### 5.3.2.1. Transfektion von Säugerzellen mit Calcium-Phosphat

Nicht alle Zellen vertragen eine Lipofektion. Für die Transfektion von RAT1 wird die Calcium-Phosphat-Methode angewendet.

Alle folgenden Mengenangaben beziehen sich auf die Transfektion von Zellen auf SP („small plate“, 60 mm) und sind bei Bedarf an kleinere Kulturgefäße anzupassen. 1-2 h vor der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel und pro SP werden 2,5 ml frisches Medium vorgelegt. In der Zwischenzeit wird die Transfektionslösung angesetzt. Hierzu werden 112,5 µl H<sub>2</sub>O, ca. 2 µg DNA und 12,5 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> in einem Reaktionsgefäß gut vermischt. In ein Rundbodenröhrchen werden 125 µl 2x HBS gegeben und es wird mit einer langen Pasteurpipette Luft eingeblasen. Gleichzeitig wird nun langsam die DNA-Lösung zugetropft. Damit die sich bildenden Copräzipitate sehr fein werden, sollte möglichst für mindestens 30 sek Luft eingeblasen werden. Der Ansatz wird nun für 20 min bei RT inkubiert und dann vorsichtig auf die Zellen getropft. Der Transfektionsansatz verbleibt für 16 h auf den Zellen. Nach 16 h werden die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und frisches Medium wird zugesetzt. Hierbei kann auch gegebenenfalls die Induktion mit dem entsprechenden Steroidhormon erfolgen.

Die Transfektionseffizienz bei dieser Methode beträgt 10-30 % und hängt wesentlich von der Reinheit der zu transfizierenden DNA, dem pH-Wert und der Frische des Transfektionspuffers und der Größe der sich bildenden Präzipitate ab.

**Es gibt verschieden Pufferrezepte:**

#### 1) 2x HBS-Puffer (eignet sich gut für Rat1-Zellen)

280 mM	NaCl
10 mM	KCl
1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
12 mM	Glucose
50 mM	Hepes
pH 7	(für Ref 52.2 und RAT1-Zellen)

#### 2) 2x BBS-Puffer (gut für HEK293- oder HeLa-Zellen)

50 mM	BES (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub> S, Sigma)
280 mM	NaCl
1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
pH 7,1	

### 5.3.2.2. Transfektion mit Poly<sup>+</sup> (Lipofektion)

Diese Technik wurde zur Transfektion von Ref 52.2- und MCF7-Zellen eingesetzt:

Lösungen : Poly<sup>+</sup> Transfections Reagenz von *Qbiogene*  
150 mM NaCl (Steril)

Das Lipofektionsmittel umschließt die DNA in Vesikeln und erlaubt den Eintritt in die Zelle durch Verschmelzung mit der Plasmamembran.

Durchführung:

Die Angaben beziehen sich auf die Transfektion einer MP („mini plate“). In einem Reaktionsgefäß werden 150 µl des 150 mM NaCl und 0,5-1 ng DNA zusammengegeben und gevortext. Parallel dazu werden in einem zweiten Reaktionsgefäß 150 µl 150 mM NaCl und 1-2 µl Poly<sup>+</sup> zusammengegeben. Die beiden Ansätze werden gemischt und 30 min bei RT inkubiert und danach werden 300 µl des Transfektionsansatzes zu den Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgt ein Mediumwechsel, und gegebenenfalls die Induktion durch Steroidhormone.

### 5.3.2.3. siRNA-Transfektion

Zur Reduktion der Expression einzelner endogener Protein, nutzt man die RNA-Interferenz-Technik. Mittels Transfektion spezifischer RNA-Oligonukleotide wird Zelleigene fremd-RNA-Abwehr, auf endogene mRNAs gelenkt, und so die Expression des Proteins unterbunden.

Dazu wurde hier im Maßstab einer „24-Well“-Platte 100 pM of Dharmacon siRNA gegen die humane ZIPK (DAPK3) oder unspezifische Kontroll-siRNA mittels DharmaFECT 2 in LNCaP- und HEK293-Zellen transfiziert. Die effizienz der Repression kann dann im Western Blot analysiert werden.

### 5.3.3. Herstellung von Zellextrakten für den Luciferasenachweis

Die Zellextrakte wurden mit einem speziellen Lysispuffer hergestellt:

77 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
23mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2%	Triton X-100
1 mM	DTT (frisch dazugeben)
pH 7,8	



Durchführung:

Die Zellen werden zunächst 2x in PBS+ gewaschen. Dann werden 200 µl Lysispuffer/SP in die Kulturschalen gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellen abgeschabt oder gespült, in ein Reaktionsgefäß überführt, und für 60 sek bei 14.000 rpm abzentrifugiert.

#### 5.3.4. Luciferasenachweis

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfolgte durch Zugabe des Luciferasereagenz:

20 mM	Tricin pH7,8
297 mM	MgSO <sub>4</sub>
0,1 mM	EDTA
33,3 mM	DTT
544,33 µM	ATP
270 µM	Coenzym A
470 µM	Luciferin

Das Verfahren beruht auf der Lumineszenzreaktion von Luciferase und Luciferin aus dem nordamerikanischen Feuerschwanz *Photinus pyralis*. Dabei wird an der Luciferase (*E*) die Umsetzung des reduzierten Luciferins mit ATP zu einem Adenylat katalysiert, das unter Oxidation zur Lichtproduktion führt.

Die Luciferaseaktivität wird im Luminometer gemessen. Um versuchsbedingte Variationen zu mitteln, wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

#### 5.4. Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie kann die Lokalisation von Proteinen in transfizierten Zellen untersucht werden. Dies geschieht durch direkte Fluoreszenz von GFP-Fusionsproteinen oder durch indirekten, Antikörper-vermittelten Nachweis.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgt mit dem Axiophot (Zeiss) mit dem 63x Plan Neofluar-Objektiv (Zeiss) mit den folgenden Filtern:

<b>GFP</b>	Filter FT 510, BP 450-490, LP 515-565;
<b>Cy<sup>3</sup></b>	Filter FT 580, BP 546, LP 590;
<b>DAPI</b>	Filter FT 396, BP 365, LP 397;

#### 5.4.1. Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst werden die Zellen mit Paraformaldehyd und Triton X-100 fixiert und permeabilisiert: Ca. 24 h nach Beendigung der Transfektion werden die Zellen 2x für 5 min mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und anschließend für 15 min in 2% Paraformaldehyd (in PBS<sup>+</sup>) fixiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS<sup>+</sup> erfolgt die Permeabilisierung durch Inkubation der Zellen für 7 min in 0,2% Triton X-100 (in PBS<sup>+</sup>). Die so behandelten Zellen können entweder direkt eingebettet werden oder einer Immunfärbung unterzogen werden.

Nach erfolgter Fixierung und Permeabilisierung werden die Zellen für 30 min mit einer PBS<sup>+</sup>-Lösung, die 5% Milchpulver und 0,1% Triton X-100 enthält, inkubiert. Hierdurch werden unspezifische Bindungen des 1. Antikörpers verhindert. Der primäre Antikörper ( $\alpha$ -Flag) wird im Verhältnis 1:2000 in Blockierlösung verdünnt und für 1 h auf den Zellen belassen. Bevor der sekundäre Cy<sup>3</sup>-gekoppelte Antikörper zu den Zellen gegeben wird, werden diese 3x für 15 min mit PBS<sup>+</sup> gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Ziege  $\alpha$ -Maus) wird 1:500 in PBS<sup>+</sup> verdünnt und die Zellen damit für > 30 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS<sup>+</sup> für jeweils 15 min, können die Zellen eingebettet oder noch einer DAPI-Färbung unterzogen werden.

Zum Einbetten der Deckgläschen auf Objektträgern werden diese mit der Zellseite nach unten, möglichst luftblasenfrei, in einen Tropfen Einbettemulsion (*Immunotech*) gelegt. Nachdem das Medium ün bei 4°C getrocknet ist, können die Zellen am Mikroskop untersucht werden.

#### 5.4.2. DAPI-Färbung

Der Farbstoff 4',6'-Diamino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) färbt spezifisch chromosomale DNA und somit die Zellkerne an. Die Zellen werden dazu nach der Immunfärbung bzw. direkt nach der Fixierung für 15 min mit 1  $\mu$ g DAPI/ ml PBS<sup>+</sup> versetzt und 15 min bei RT geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit PBS<sup>+</sup> können die Deckgläschen auf Objektträgern eingebettet werden.

#### 5.4.3. „Green-Fluorescent“-Protein (GFP)

Das „grün fluoreszierende“ Protein stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* und enthält ein stark fluoreszierendes Chromophor, welches Licht bei einem Maximum von 395 nm absorbiert und Grünlicht von einem Maximum bei 509 nm emittiert. Wird das GFP an ein anderes, zu untersuchendes Protein (in diesem Fall AATF bzw. AATF-Deletionsmutanten) fusioniert, so kann die Lokalisation des Fusionsproteins in der Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Die Lokalisation des Fusionsproteins

sollte hierbei durch den Fusionspartner und nicht durch das GFP bestimmt sein. Mit diesem System bietet sich also die Möglichkeit, die Lokalisation eines Proteins in einer lebenden Zelle, über einen längeren Zeitraum und ohne spezifische Antikörper zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden Konstrukte des peGFP-Vektors von *Clontech* verwendet. Beim eGFP handelt es sich um eine „red-shift“ Variante des Wildtyp-GFP, mit einer verstärkten Emission. Der Fusionspartner wird C- oder N-terminal an das eGFP-Gen kloniert. Dem Gen ist ein CMV-Promotor vorgeschaltet, der eine starke Expression ermöglicht.

**Abkürzungsverzeichnis:**

AATF	<i>Apoptosis-antagonizingtranscription factor</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	carboxy-
CDC5	<i>Cell division cycle 5</i>
cDNA	copy DNA, komplementäre DNA
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> , alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm Ck2 <i>Casein kinase 2</i>
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CMV	Cytomegalievirus
Δ	Delta, zeigt eine Mutation oder Deletion an
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol- Dihydrochlorid
DAP	<i>Death associated protein</i>
DAPK	<i>Death associated protein kinase</i>
DIK	<i>DAP-like kinase</i> = ZIPK aus der Ratte
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'- triphosphat
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , Wachstumshormon
E2F	Eukaryontischer Transkriptionsfaktor
ER	Estrogenrezeptor
et al.	et alteri (und Mitarbeiter)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FCS	fötales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , Wachstumshormon
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
GR	Glukokortikoidrezeptor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H3, H4	Histone
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K42A	Besagt, dass in diesem Protein das Lysin 42 durch Alanin ersetzt wurde
LB	Luria-Bertani
LT	<i>Large T-Antigen</i> , großes TAntigen von SV40
Lx-Motiv	Consensus LxxLL, Interaktionsmotiv für Kofaktoren der Kernrezeptoren
LZ	Leuzin-Zipper
Luc	Luciferase
mind.	mindestens
MMTV	Mouse mammary tumor virus

MLC	<i>myosin light chain</i>
mod.	modifiziert
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
N-	amino-
NEM	N-Ethylmaleinimid
NGF	<i>Neural growth factor</i> , Wachstumshormon
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Par-4	<i>Prostate apoptosis response gene-4</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin /Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Konzentration
PLP	Phosphat-Lysispuffer
PML	<i>promyelocytic leukemia</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSA	Prostate specific antigen
p21	Zellzyklusinhibitor
p53	Tumorsuppressor, Transkriptionsfaktor
Rb	Retinoblastomprotein
RLU	Relative Luciferase Units
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Saure domäne bei AATF
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Ser	Serin
SR-	Protein <i>Serine-arginine</i> protein
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
T	Thymin
Thr	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TA	Annealing Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
U <i>Unit</i>	(Einheit der Enzymaktivität)
ün	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
w/v	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp
w/o	ohne (with out)
ZIPK	Zipper interacting kinase (humane Dlk)

Die gängigen SI Einheiten sowie Symbole für chemische Elemente wurden in dieses Abkürzungsverzeichnis nicht mit aufgenommen.

## Literaturverzeichnis:

- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271(34):20246-9.
- Amit I, Yakir L, Katz M, Zwang Y, Marmor MD, Citri A, Shtiegman K, Alroy I, Tuvia S, Reiss Y, Roubini E, Cohen M, Wides R, Bacharach E, Schubert U, Yarden Y. Tal, a Tsg101-specific E3 ubiquitin ligase, regulates receptor endocytosis and retrovirus budding. *Genes Dev.* 2004 Jul 15;18(14):1737-52.
- Appel, Sarah (2007) Untersuchungen des pro-apoptotischen Proteins Par-4 und seiner Interaktionspartner Dlk, Amida und EFP1 Dissertation, Universität Bonn
- Baffy, G., Miyashita, T., Williamson, J.R. and Reed, J.C. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J. Biol. Chem.*, (1993) 268,6511-6519.
- Baretton GB, Klenk U, Diebold J, Schmeller N, Lohrs U. Proliferation- and apoptosis-associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression. *Br J Cancer.* 1999 May;80(3-4):546-55.
- Barradas M, Monjas A, Diaz-Meco MT, Serrano M, Moscat J. The downregulation of the pro-apoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression. *EMBO J.* 1999 Nov 15;18(22):6362-9.
- Battle TE, Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med.* 2002 Jun;2(4):381-92.
- Bellido T, O'Brien CA, Roberson PK, Manolagas SC. Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 1998 Aug 14;273(33):21137-44.
- Bernardi R, Pandolfi PP. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene.* 2003 Dec 8;22(56):9048-57.
- Bernstein, H.S. and Coughlin, S.R. A mammalian homolog of fission yeast Cdc5 regulates G2 progression and mitotic entry. *J. Biol. Chem.*, (1998) 273, 4666-4671.
- Bernstein, B.E. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2002) 99, 8695-8700
- Bernstein, H.S. and Coughlin, S.R. Pombe Cdc5-related protein. A putative human transcription factor implicated in mitogen-activated signaling. *J. Biol. Chem.*, (1997) 272, 5833-5837.
- Bialik S, Bresnick AR, Kimchi A. DAP-kinase-mediated morphological changes are localization dependent and involve myosin-II phosphorylation. *Cell Death Differ.* 2004 Jun;11(6):631-44.

Bledose, R.K., Montana, V.G., Stanley, TH.B., Delves, Ch.J., Apolito, CH.J., Parks, D.J., Steward, E.L., Willson, T.M., Lambert, K.H., Moore, J.T., Pearce, K.H., Xu, H.E.  
Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerisation and coactivator recognition.  
*Cell* (2002) 110, 93-105.

Boghaert, E.R., Sells, S.F., Walid, A.J., Malone, P., Williams, N.M., Weinstein, M.H., Strange, R. and Rangnekar, V.M.  
Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues.  
*Cell Growth Differ.*, (1997) 8, 881-890.

Borman MA, MacDonald JA, Haystead TA.  
Staurosporine inhibition of zipper-interacting protein kinase contractile effects in gastrointestinal smooth muscle.  
*Biochem Cell Biol.* 2007 Feb;85(1):111-20.

Boosen, Maike (2007). Molekulargenetische und Zellbiologische Untersuchungen zur Par-4-induzierten Apoptose. Dissertation, Universität Bonn

Brazil DP, Hemmings BA.  
Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow.  
*Trends Biochem Sci.* 2001 Nov;26(11):657-64.

Bruno, M. et al. Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities.  
*Mol. Cell* (2003) 12, 1599–1606

Burch LR, Scott M, Pohler E, Meek D, Hupp T.  
Phage-peptide display identifies the interferon-responsive, death-activated protein kinase family as a novel modifier of MDM2 and p21WAF1.  
*J Mol Biol.* 2004 Mar 12;337(1):115-28.

Burgdorf, Sven (2003); Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors AATF. Dissertation, Universität Bonn.

Burgdorf, S., Leister, P. and Scheidtmann, K.H.  
TSG101 interacts with apoptosis-antagonizing transcription factor and enhances androgen receptor-mediated transcription by promoting its monoubiquitination.  
*J. Biol. Chem.*, (2004) 279, 17524-17534.

Burke HB, Bostwick DG, Meiers I, Montironi R  
Prostate cancer outcome: epidemiology and biostatistics.  
*Anal Quant Cytol Histol.* 2005 Aug;27(4):211-7.

Carter CA.  
Tsg101: HIV-1's ticket to ride.  
*Trends Microbiol.* 2002 May;10(5):203-5.

Bruno, T., De Angelis, R., De Nicola, F., Barbato, Ch., Di Padova, M., Corbi, N., Libri, V., Benassi, B., Mattei, E., Ch'ersi, A., Sodu, S., Floridi A., Passanati, C., Fanciulli, M.  
Che-1 affects cell growth by interfering with the recruitment of HADC1 by Rb.  
*Cancer Cell.* (2002) 2. 387-399.

Bruno T, De Nicola F, Iezzi S, Lecis D, D'Angelo C, Di Padova M, Corbi N, Dimiziani L, Zannini L, Jekimovs C, Scarsella M, Porrello A, Chersi A, Crescenzi M, Leonetti C, Khanna KK, Soddu S, Floridi A, Passananti C, Delia D, Fanciulli M.  
Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint.  
*Cancer Cell.* 2006 Dec;10(6):473-86.

Burns, C.G., Ohi, R., Mehta, S., O'Toole, E.T., Winey, M., Clark, T.A., Sugnet, C.W., Ares, M., Jr. and Gould, K.L.

Removal of a single alpha-tubulin gene intron suppresses cell cycle arrest phenotypes of splicing factor mutations in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Mol. Cell Biol.*, (2002) 22, 801-815.

Burns, C.G., Ohi, R., Krainer, A.R. and Gould, K.L.

Evidence that Myb-related CDC5 proteins are required for pre-mRNA splicing.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1999) 96, 13789-13794.

Bustin, M.

The Dynamics of Histone H1 Function in Chromatin.

*Mol. Cell*. (2005) 17, 617-620

Chadin AV, Belokurova MV, Stepanova OV, Ivanova MV, Shirinskii VP.

Content of myosin-activating protein kinases in myocardium of patients with dilated cardiomyopathy and in the animal heart.

*Biofizika*. 2006 Sep-Oct;51(5):924-8.

Chakravati, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, E.G., Juguilon, H.,

Evans, R.M.: The role of CBP/p300 in nuclear receptor signaling.

*Nature* 383, 99-103.

Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA.

Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention.

*Leukemia*. 2003 Jul;17(7):1263-93. Review.

Cheema SK, Mishra SK, Rangnekar VM, Tari AM, Kumar R, Lopez-Berestein G.

Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter.

*J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):19995-20005.

Chua HH, Lee HH, Chang SS, Lu CC, Yeh TH, Hsu TY, Cheng TH, Cheng JT, Chen MR, Tsai CH.

Role of the TSG101 gene in Epstein-Barr virus late gene transcription.

*J Virol*. 2007 Mar;81(5):2459-71.

Cohen, O., Inbal, B., Kissil, J.L., Raveh, T., Berissi, H., Spivak-Kroizaman, T., Feinstein, E. and Kimchi, A.

DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain.

*J. Cell Biol.*, (1999) 146, 141-148.

Cohen, O., Feinstein, E. and Kimchi, A.

DAP-kinase is a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity.

*EMBO J.*, (1997) 16, 998-1008.

Cohen, O. and Kimchi, A.

DAP-kinase: from functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer. *Cell*

*Death. Differ.*, (2001) 8, 6-15.

Coqueret O.

Linking cyclins to transcriptional control.

*Gene*. 2002 Oct 16;299(1-2):35-55. Review.

MacCorkle RA, Tan TH.

Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control.

*Cell Biochem Biophys*. 2005;43(3):451-61. Review.



- Deiss, L.P., Feinstein, E., Berissi, H., Cohen, O. and Kimchi, A.  
Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death.  
*Genes Dev.*, (1995) 9, 15-30.
- DeNicola F, Bruno T, Iezzi S, Di Padova M, Floridi A, Passananti C, Del Sal G, Fanciulli M.  
The prolyl isomerase Pin1 affects Che-1 stability in response to apoptotic DNA damage.  
*J Biol Chem.* 2007 Jul 6;282(27):19685-91.
- Diffley JF.  
Regulation of early events in chromosome replication.  
*Curr Biol.* 2004 Sep 21;14(18):R778-86. Review.
- Dilworth, F.J. and Chambon, P.  
Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodelling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription.  
*Oncogene* (2001) 20. 2047-3054.
- MacDonald JA, Eto M, Borman MA, Brautigam DL, Haystead TA.  
Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase.  
*FEBS Lett.* 2001 Mar 30;493(2-3):91-4.
- MacDonald, J.A., Borman, M.A., Muranyi, A., Somlyo, A.V., Hartshorne, D.J. and Haystead, T.A.  
Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (2001) 98, 2419-2424.
- MacDonald, W.H., Ohi, R., Smelkova, N., Friendewey, D. and Gould, K.L.  
Myb-related fission yeast cdc5p is a component of a 40S snRNP-containing complex and is essential for pre-mRNA splicing.  
*Mol. Cell Biol.*, (1999) 19, 5352-5362.
- Dunn KL, Davie JR.  
Stimulation of the Ras-MAPK pathway leads to independent phosphorylation of histone H3 on serine 10 and 28.  
*Oncogene.* 2005 May 12;24(21):3492-502.
- Dupre S, Volland C, Haguenaer-Tsapis R.  
Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting.  
*Curr Biol.* 2001 Nov 13;11(22):R932-4. Review
- Engemann, Harald Gottlieb (2006); Charakterisierung der Dlk/CDC5 Interaktion und der Genstruktur des *Dlk* Gens. Dissertation, Universität Bonn
- Engemann, H., Heinzl, V., Page, G., Preuss, U. and Scheidtmann, K.H.  
DAP-like kinase interacts with the rat homolog of *Schizosaccharomyces pombe* CDC5 protein, a factor involved in pre-mRNA splicing and required for G2/M phase transition.  
*Nucleic Acids Res.*, (2002) 30, 1408-1417.
- El-Guendy N, Zhao Y, Gurusurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM.  
Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells.  
*Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(16):5516-25.
- Eskiw CH, Bazett-Jones DP.  
The promyelocytic leukemia nuclear body: sites of activity?  
*Biochem Cell Biol.* 2002;80(3):301-10. Review.
- Estrada P, Kim J, Coleman J, Walker L, Dunn B, Takizawa P, Novick P, Ferro-Novick S.  
Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*.  
*J Cell Biol.* 2003 Dec 22;163(6):1255-66.

Fan M, Nakshatri H, Nephew KP.

Inhibiting proteasomal proteolysis sustains estrogen receptor-alpha activation.

*Mol Endocrinol.* 2004 Nov;18(11):2603-15. Epub 2004 Jul 29.

Fanciulli, M., Bruno, T., Di Padova, M., De Angelis, R., Iezzi, S., Iacobini, C., Floridi, A. and Passananti, C.

Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb.

*FASEB J.*, (2000) 14, 904-912.

Felten A, Leister P, Burgdorf S, Uhlmann L, Scheidtmann KH.

Characterization of rat BLOS2/Ceap, a putative yeast She3 homolog, as interaction partner of apoptosis antagonizing transcription factor/Che-1.

*Biol Chem.* 2007 Jun;388(6):569-82.

Felten, Andrea (2006) Charakterisierung eines neuen Interaktionspartners des Transkriptionsfaktors AATF: - SHIA -. Diplomarbeit, Universität Bonn.

Fisher RP.

Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription.

*J Cell Sci.* 2005 Nov 15;118(Pt 22):5171-80. Review.

FitzGerald TJ, Simon E, Meyer J.

Prostate carcinoma: opportunities for translational research.

*J Cell Biochem.* 2004 Feb 15;91(3):433-42.

Fizazi K, Martinez LA, Sikes CR, Johnston DA, Stephens LC, McDonnell TJ, Logothetis CJ, Trapman J, Pisters LL, Ordonez NG, Troncoso P, Navone NM.

The association of p21((WAF-1/CIP1)) with progression to androgen-independent prostate cancer.

*Clin Cancer Res.* 2002 Mar;8(3):775-81.

Floridi A, Fanciulli M.

Che-1: a new effector of checkpoints signaling.

*Cell Cycle.* 2007 Apr;6(7):804-6. Epub 2007 Apr 22. Review.

Folkertsma S, van Noort PI, Brandt RF, Bettler E, Vriend G, de Vlieg J.

The nuclear receptor ligand-binding domain: a family-based structure analysis.

*Curr Med Chem.* 2005;12(9):1001-16.

Fotedar R, Fotedar A.

Cell cycle control of DNA replication.

*Prog Cell Cycle Res.* 1995;1:73-89. Review.

Gachet Y, Reyes C, Goldstone S, Tournier S.

The fission yeast spindle orientation checkpoint: a model that generates tension?

*Yeast.* 2006 Oct 15;23(13):1015-29.

Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL.

p21--negative regulator of the cell cycle.

*Proc Soc Exp Biol Med.* 1996 Nov;213(2):138-49. Review.

Gao S, Wang H, Lee P, Melamed J, Li CX, Zhang F, Wu H, Zhou L, Wang Z.

Androgen receptor and prostate apoptosis response factor-4 target the c-FLIP gene to determine survival and apoptosis in the prostate gland.

*J Mol Endocrinol.* 2006 Jun;36(3):463-83.

Gao X, Mohsin SK, Gatalica Z, Fu G, Sharma P, Nawaz Z.

Decreased expression of e6-associated protein in breast and prostate carcinomas.

*Endocrinology.* 2005 Apr;146(4):1707-12.

- Glass, Ch.K. and Rosenfeld, M.G.  
The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors.  
*Genes & Development* (2000) 14. 121-141.
- Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K.  
Cell proliferation and cell cycle control: a mini review.  
*Int J Clin Pract.* 2004 Dec;58(12):1134-41.
- Gonsalvez GB, Little JL, Long RM.  
ASH1 mRNA anchoring requires reorganization of the Myo4p-She3p-She2p transport complex.  
*J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):46286-94.
- Golsteyn RM, Lane HA, Mundt KE, Arnaud L, Nigg EA.  
The family of polo-like kinases.  
*Prog Cell Cycle Res.* 1996;2:107-14.
- Gozuacik D, Kimchi A.  
DAPk protein family and cancer.  
*Autophagy.* 2006 Apr-Jun;2(2):74-9. Review.
- Graves PR, Winkfield KM, Haystead TA.  
Regulation of zipper-interacting protein kinase activity in vitro and in vivo by multisite phosphorylation.  
*J Biol Chem.* 2005 Mar 11;280(10):9363-74. Erratum in: *J Biol Chem.* 2005 Jun 17;280(24):23424.
- Griffiths K, Morton MS, Nicholson RI.  
Androgens, androgen receptors, antiandrogens and the treatment of prostate cancer.  
*Eur Urol.* 1997;32 Suppl 3:24-40.
- Gronau E, Goppelt M, Harzmann R, Weckermann D.  
Prostate cancer relapse after therapy with curative intention: a diagnostic and therapeutic dilemma.  
*Onkologie.* 2005 Jun;28(6-7):361-6.
- EI-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM.  
Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells.  
*Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(16):5516-25.
- Guo Q, Xie J.  
AATF inhibits aberrant production of amyloid beta peptide 1-42 by interacting directly with Par-4.  
*J Biol Chem.* 2004 Feb 6;279(6):4596-603.
- Gurumurthy S, Rangnekar VM.  
Par-4 inducible apoptosis in prostate cancer cells.  
*J Cell Biochem.* 2004 Feb 15;91(3):504-12. Review.
- Hagerty L, Weitzel DH, Chambers J, Fortner CN, Brush MH, Loiselle D, Hosoya H, Haystead TA.  
ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase.  
*J Biol Chem.* 2007 Feb 16;282(7):4884-93.  
16;282(7):4884-93.
- Hanks,S.K. and Quinn,A.M.  
Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members.  
*Methods Enzymol.*, (1991) 200, 38-62.
- Hanks,S.K., Quinn,A.M. and Hunter,T.  
The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.  
*Science*, (1988) 241, 42-52.
- Halazonetis TD, Bartek J.  
DNA damage signaling recruits the RNA polymerase II binding protein Che-1 to the p53 promoter.  
*Mol Cell.* 2006 Dec 28;24(6):809-10. Review.

- Hamamura K, Yokota H.  
Stress to endoplasmic reticulum of mouse osteoblasts induces apoptosis and transcriptional activation for bone remodeling.  
*FEBS Lett.* 2007 May 1;581(9):1769-74.
- Hart, L.L., Davie, J.R.  
The Estrogenrezeptor: more than an average Transcriptionfaktor.  
*Biochem.Cell.Biol.* (2002) 80 (3) 335-341.
- Haystead TA.  
ZIP kinase, a key regulator of myosin protein phosphatase 1.  
*Cell Signal.* 2005 Nov;17(11):1313-22. Review.
- Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S, Sasaki Y.  
"Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C."  
*Biochemistry.* (1984) 23(21):5036-41.
- Hirst J, Seaman MN, Buschow SI, Robinson MS.  
The role of cargo proteins in GGA recruitment.  
*Traffic.* 2007 May;8(5):594-604.
- Ihara E, MacDonald JA.  
The regulation of smooth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase.  
*Can J Physiol Pharmacol.* 2007 Jan;85(1):79-87.
- Ihara E, Edwards E, Borman MA, Wilson DP, Walsh MP, MacDonald JA.  
Inhibition of zipper-interacting protein kinase function in smooth muscle by a myosin light chain kinase pseudosubstrate peptide.  
*Mol Cell.* 2005 Sep 2;19(5):631-42.
- Imam Chasan, Achmet (2007); Charakterisierung von interferierenden Mutanten der Dlk/ZIPK.  
Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Inbal,B., Cohen,O., Polak-Charcon,S., Kopolovic,J., Vadai,E., Eisenbach,L. and Kimchi,A.  
DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis.  
*Nature*, (1997) 390, 180-184.
- Inbal,B., Shani,G., Cohen,O., Kissil,J.L. and Kimchi,A.  
Death-associated protein kinase related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. *Mol.Cell Biol.*, (2000) 20, 1044-1054.
- Ishov, A.; Sotnikov, A.G.; Negorev, D.; Vladimirova, O.V.; Neff, N.; Kamitani, T.; Yeh, Strauss, J.F. and Maul G.G.  
PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1.  
*JBC* (1999) 147(2) 221-233
- Jackson DA.  
The amazing complexity of transcription factories.  
*Brief Funct Genomic Proteomic.* 2005 Jul;4(2):143-57. Review.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D.  
Translating the histone code.  
*Science* (2001) 293, 1074–1080
- Jerry DJ, Dickinson ES, Roberts AL, Said TK.  
Regulation of apoptosis during mammary involution by the p53 tumor suppressor gene.  
*J Dairy Sci.* 2002 May;85(5):1103-10.

- Jin, Y., Blue, E.K., Dixon, S., Hou, L., Wysolmerski, R.B. and Gallagher, P.J.  
Identification of a new form of death-associated protein kinase that promotes cell survival.  
*J. Biol. Chem.*, (2001) 276, 39667-39678.
- Johnstone, R.W., See, R.H., Sells, S.F., Wang, J., Muthukkumar, S., Englert, C., Haber, D.A., Licht, J.D., Sugrue, S.P., Roberts, T. *et al.*  
A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1.  
*Mol. Cell Biol.*, (1996) 16, 6945-6956.
- Joshi, A.A. and Struhl, K.  
Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation.  
*Mol. Cell* (2005) 20, 971-978
- Kang Z, Jänne OA, Palvimo JJ.  
Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor.  
*Mol Endocrinol.* 2004 Nov;18(11):2633-48. Epub 2004 Aug 12.
- Kato J.  
Induction of S phase by G1 regulatory factors.  
*Front Biosci.* 1999 Dec 1;4:D787-92. Review.
- Kawai T, Akira S, Reed JC.  
ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains.  
*Mol Cell Biol.* 2003 Sep;23(17):6174-86.
- Kawai, T., Matsumoto, M., Takeda, K., Sanjo, H. and Akira, S.  
ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis.  
*Mol. Cell Biol.*, (1998) 18, 1642-1651.
- Kawai, T., Nomura, F., Hoshino, K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. and Akira, S.  
Death-associated protein kinase 2 is a new calcium/calmodulin-dependent protein kinase that signals apoptosis through its catalytic activity.  
*Oncogene*, (1999) 18, 3471-3480.
- Kawamoto S, Hidaka H  
"1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets"  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1984) 125(1):258-64.
- Kemp, B.E. and Pearson, R.B.  
Intrasteric regulation of protein kinases and phosphatases.  
*Biochim. Biophys. Acta*, (1991) 1094, 67-76.
- Kenai, Y., Xy, L., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W. Glass, C.K., Rosenfeld M.G.  
A CBP-Intergratorkomplex mediats transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors.  
*Cell* (1996) 85. 403-414.
- McKenna, N.J., O'Malley, B.W.  
Combinatorial Control of Gen Expression by Nuclear Receptors and Coregulators.  
*Cell*, (2002) 108, 465-474.
- Keogh, M.C. *et al.* Cotranscriptional Set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex.  
*Cell* (2005) 123, 593-605

- Khan OY, Fu G, Ismail A, Srinivasan S, Cao X, Tu Y, Lu S, Nawaz Z.  
Multifunction steroid receptor coactivator, E6-associated protein, is involved in development of the prostate gland.  
*Mol Endocrinol.* 2006 Mar;20(3):544-59.
- Kim D, Chung J.  
Akt: versatile mediator of cell survival and beyond.  
*J Biochem Mol Biol.* 2002 Jan 31;35(1):106-15.
- Kinyamu HK, Chen J, Archer TK.  
Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors.  
*J Mol Endocrinol.* 2005 Apr;34(2):281-97. Review.
- Kiss E, Muranyi A, Csontos C, Gergely P, Ito M, Hartshorne DJ, Erdodi F.  
Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton.  
*Biochem J.* 2002 Jul 1;365(Pt 1):79-87.
- Kissil, J.L., Feinstein, E., Cohen, O., Jones, P.A., Tsai, Y.C., Knowles, M.A., Eydmann, M.E. and Kimchi, A.  
DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene.  
*Oncogene*, (1997) 15, 403-407.
- Kögel, D., Bierbaum, H., Preuss, U. and Scheidtmann, K.H.  
C-terminal truncation of Dlk/ZIP kinase leads to abrogation of nuclear transport and high apoptotic activity.  
*Oncogene*, (1999) 18, 7212-7218.
- Kögel, D., Plöttner, O., Landsberg, G., Christian, S. and Scheidtmann, K.H.  
Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones.  
*Oncogene*, (1998) 17, 2645-2654.
- Kögel, D., Prehn, J.H. and Scheidtmann, K.H.  
The DAP kinase family of pro-apoptotic proteins: novel players in the apoptotic game.  
*Bioessays*, (2001) 23, 352-358.
- Kögel, D., Reimertz, C., Dussmann, H., Mech, P., Scheidtmann, K.H. and Prehn, J.H.  
The death associated protein (DAP) kinase homologue Dlk/ZIP kinase induces p19ARF- and p53-independent apoptosis.  
*Eur. J. Cancer*, (2003) 39, 249-256.
- Komatsu, S. and Ikebe, M.  
ZIP kinase is responsible for the phosphorylation of myosin II and necessary for cell motility in mammalian fibroblasts.  
*J. Cell Biol.*, (2004) 165, 243-254.
- Koonin EV, Abagyan RA.  
TSG101 may be the prototype of a class of dominant negative ubiquitin regulators.  
*Nat Genet.* 1997 Aug;16(4):330-1.
- Krebs E.G.  
The phosphorylation of proteins: a major mechanism for biological regulation.  
Fourteenth Sir Frederick Gowland Hopkins memorial lecture.  
*Biochem. Soc. Trans.*, (1985) 13, 813-820.
- Krebs EG, Beavo JA.  
Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes.  
*Annu Rev Biochem.* 1979; 48:923-59.

- Laïos I, Journé F, Nonclercq D, Vidal DS, Toillon RA, Laurent G, Leclercq G.  
Role of the proteasome in the regulation of estrogen receptor alpha turnover and function in MCF-7 breast carcinoma cells.  
*J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 Mar;94(4):347-59.
- La Thangue NB.  
E2F and the molecular mechanisms of early cell-cycle control.  
*Biochem Soc Trans.* 1996 Feb;24(1):54-9. Review.
- Lee JH, Volinic JL, Banz C, Yao KM, Thomas MK.  
Interactions with p300 enhance transcriptional activation by the PDZ-domain coactivator Bridge-1.  
*J Endocrinol.* 2005 Nov;187(2):283-92.
- Lees E.  
Cyclin dependent kinase regulation.  
*Curr Opin Cell Biol.* 1995 Dec;7(6):773-80. Review.
- Leister, Peter Heinrich (2003); Untersuchung des Transkriptionsfaktors AATF als Koaktivator von Steroidrezeptoren. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Leister,P., Burgdorf,S. and Scheidtmann,K.H.  
Apoptosis Antagonizing Transcription Factor AATF is a novel co-activator of nuclear hormone receptors.  
*Signal Transduction* (2003) 3, 17-25.
- Lemieux P, Fuqua S.  
The role of the estrogen receptor in tumor progression.  
*J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996 Jan;56(1-6 Spec No):87-91. Review.
- Liang J, Slingerland JM.  
Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression.  
*Cell Cycle.* 2003 Jul-Aug;2(4):339-45. Review
- Lin DY, Fang HI, Ma AH, Huang YS, Pu YS, Jenster G, Kung HJ, Shih HM.  
Negative modulation of androgen receptor transcriptional activity by Daxx.  
*Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(24):10529-41.
- Lindfors,K., Halttunen,T., Huotari,P., Nupponen,N., Vihinen,M., Visakorpi,T., Maki,M. and Kainulainen,H.  
Identification of novel transcription factor-like gene from human intestinal cells.  
*Biochem.Biophys.Res.Commun.*, (2000) 276, 660-666.
- MacCorkle RA, Tan TH.  
Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control.  
*Cell Biochem Biophys.* 2005;43(3):451-61. Review.
- MacDonald JA, Eto M, Borman MA, Brautigan DL, Haystead TA.  
Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase.  
*FEBS Lett.* 2001 Mar 30;493(2-3):91-4.
- Manning,G., Whyte,D.B., Martinez,R., Hunter,T. and Sudarsanam,S.  
The protein kinase complement of the human genome.  
*Science*, (2002) 298, 1912-1934.
- Margueron R, Trojer P, Reinberg D.  
The key to development: interpreting the histone code?  
*Curr Opin Genet Dev.* 2005 Apr;15(2):163-76. Review.

- Martinez LA, Yang J, Vazquez ES, Rodriguez-Vargas Mdel C, Olive M, Hsieh JT, Logothetis CJ, Navone NM.  
p21 modulates threshold of apoptosis induced by DNA-damage and growth factor withdrawal in prostate cancer cells.  
*Carcinogenesis*. 2002 Aug;23(8):1289-96.
- Mattera R, Puertollano R, Smith WJ, Bonifacino JS.  
The trihelical bundle subdomain of the GGA proteins interacts with multiple partners through overlapping but distinct sites.  
*J Biol Chem*. 2004 Jul 23;279(30):31409-18.
- Means, A.R., Comstock, J.P., Rosenfeld, G.C., O'Malley, B.W.: Ovalbumin messenger RNA of chick oviduct: partial characterization, estrogen dependence and translation in vitro.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 69.(2000) 1146-1150.
- Means AR, O'Malley BW.  
Mechanism of estrogen action: early transcriptional and translational events.  
*Metabolism*. 1972 Apr;21(4):357-70.
- Mellor J.  
Dynamic nucleosomes and gene transcription  
*TRENDS in Genetics*. June 2006 Vol.22 No.6
- Metivier, R.  
Transcriptional complexes engaged by apoestrogen receptor- $\alpha$  isoforms have divergent outcomes.  
*EMBO J*. (2004) 23,3653–3666.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R.  
LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription.  
*Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):436-9.
- De Miguel F, Lee SO, Onate SA, Gao AC.  
Stat3 enhances transactivation of steroid hormone receptors.  
*Nucl Recept*. 2003 Jun 13;1(1):3.
- Mizuta H, Kuroda Y.  
Cloning and functional characterization of a rat Daxx that functions as a corepressor for the androgen receptor.  
*Cell Biol Int*. 2004;28(8-9):609-14.
- Moehren U, Eckey M, Baniahmad A.  
Gene repression by nuclear hormone receptors.  
*Essays Biochem*. 2004;40:89-104. Review.
- Monteiro, A.N.A.; August, A. and Hanafusa, H.  
Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region.  
*PNAS* (1996) 93: 13595-13599
- Morris, S.A.  
Histone H3 K36 methylation is associated with transcription elongation in *Schizosaccharomyces pombe*.  
*Eukaryot*.  
*Cell* (2005) 4, 1446–1454
- Murata-Hori M, Suizu F, Iwasaki T, Kikuchi A, Hosoya H.  
ZIP kinase identified as a novel myosin regulatory light chain kinase in HeLa cells.  
*FEBS Lett*. 1999 14;451(1):81-4.
- Musashi M, Ota S, Shiroshita N.  
The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis.  
*Int J Hematol*. 2000 Jul;72(1):12-9. Review.



Nagaich, A.K. et al. Rapid periodic binding and displacement of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling.

*Mol. Cell* (2004) 14,163–174

Nakayama KI, Nakayama K.

Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer.

*Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):369-81. Review.

Napolitano G, Majello B, Lania L.

Role of cyclinT/Cdk9 complex in basal and regulated transcription (review).

*Int J Oncol*. 2002 Jul;21(1):171-7. Review.

Nasmyth, K. and Nurse, P.

Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

*Mol. Gen. Genet.*, (1981) 182, 119-124.

Nelson JD, Denisenko O, Bomsztyk K.

Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method.

*Nat Protoc*. 2006;1(1):179-85.

Nelson, P.S., Clegg, N., Arnold, H., Ferguson, C., Bonham, M., Withe, J., Hood, L.

The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium.

*PNAS* (2002) 11890-11895.

DeNicola F, Bruno T, Iezzi S, Di Padova M, Floridi A, Passananti C, Del Sal G, Fanciulli M. The prolyl isomerase Pin1 affects CHE-1 stability in response to apoptotic DNA damage.

*J Biol Chem*. 2007 Apr 27.

Niisato N, Ito Y, Marunaka Y.

Effects of PKA inhibitors, H-compounds, on epithelial Na<sup>+</sup> channels via PKA-independent mechanisms.

*Life Sci*. 1999;65(10):PL109-14.

Nigg EA.

Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle.

*Bioessays*. 1995 Jun;17(6):471-80. Review.

Nowak S.J. and Corces V.G.

Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation

*TRENDS in Genetics* 2004 Vol.20 No.4 April

Obradovic D, Tirard M, Nemethy Z, Hirsch O, Gronemeyer H, Almeida OF.

DAXX, FLASH, and FAF-1 modulate mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated transcription in hippocampal cells--toward a basis for the opposite actions elicited by two nuclear receptors?

*Mol Pharmacol*. 2004 Mar;65(3):761-9.

Ohi, R., Feoktistova, A., McCann, S., Valentine, V., Look, A.T., Lipsick, J.S. and Gould, K.L.

Myb-related *Schizosaccharomyces pombe* cdc5p is structurally and functionally conserved in eukaryotes.

*Mol. Cell Biol.*, (1998) 18, 4097-4108.

Ohtani K.

Implication of transcription factor E2F in regulation of DNA replication.

*Front Biosci*. 1999 Dec 1;4:D793-804. Review.

Omar EA, Behloul H, Chevalier S, Aprikian AG.

Relationship of p21(WAF-1) protein expression with prognosis in advanced prostate cancer treated by androgen ablation.

*Prostate*. 2001 Nov 1;49(3):191-9.

- DiPadova M, Bruno T, De Nicola F, Iezzi S, D'Angelo C, Gallo R, Nicosia D, Corbi N, Biroccio A, Floridi A, Passananti C, Fanciulli M.  
Che-1 arrests human colon carcinoma cell proliferation by displacing HDAC1 from the p21WAF1/CIP1 promoter.  
*J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36496-504.
- Page,G., Lödige,I., Kögel,D. and Scheidtmann,K.H.  
AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis.  
*FEBS Lett.*, (1999) 462, 187-191.
- Page,G., Kögel,D., Rangnekar,V. and Scheidtmann,K.H.  
Interaction partners of Dlk/ZIP kinase: co-expression of Dlk/ZIP kinase and Par-4 results in cytoplasmic retention and apoptosis.  
*Oncogene*, (1999) 18, 7265-7273.
- Park, Y.J. et al. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding.  
*J. Biol.Chem.* (2005) 280, 1817–1825.
- Passananti C, Fanciulli M.  
The anti-apoptotic factor Che-1/AATF links transcriptional regulation, cell cycle control, and DNA damage response.  
*Cell Div.* 2007 Jul 16;2(1):21.
- Phair, R.D. et al. Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins.  
*Mol. Cell. Biol.* (2004) 24, 6393–6402
- Pinton,P., Ferrari,D., Magalhaes,P., Schulze-Osthoff,K., Di Virgilio,F., Pozzan,T. and Rizzuto,R.  
Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells.  
*J.Cell Biol.*, (2000) 148, 857-862.
- Pollack A, Zagars GK.  
External beam radiotherapy dose response of prostate cancer.  
*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 Dec 1;39(5):1011-8.
- Pornillos O, Alam SL, Rich RL, Myszka DG, Davis DR, Sundquist WI.  
Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain.  
*EMBO J.* 2002 May 15;21(10):2397-406.
- Puertollano R, Bonifacino JS.  
Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery.  
*Nat Cell Biol.* 2004 Mar;6(3):244-51.
- Preuss,U., Bierbaum,H., Buchenau,P. and Scheidtmann,K.H.  
DAP-like kinase, a member of the death-associated protein kinase family, associates with centrosomes, centromeres, and the contractile ring during mitosis.  
*Eur.J.Cell Biol.*, (2003) 82, 447-459.
- Preuss,U., Landsberg,G. and Scheidtmann,K.H.  
Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res.*, (2003) 31, 878-885.
- Qiu SG, Krishnan S, el-Guendy N, Rangnekar VM.  
Negative regulation of Par-4 by oncogenic Ras is essential for cellular transformation.  
*Oncogene.* 1999 Nov 25;18(50):7115-23.
- Rangnekar VM.  
Apoptosis mediated by a novel leucine zipper protein Par-4.  
*Apoptosis.* 1998 Mar;3(2):61-6.

- Raveh, T., Berissi, H., Eisenstein, M., Spivak, T. and Kimchi, A.  
A functional genetic screen identifies regions at the C-terminal tail and death-domain of death-associated protein kinase that are critical for its proapoptotic activity.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (2000) 97, 1572-1577.
- Raveh, T., Droguett, G., Horwitz, M.S., DePinho, R.A. and Kimchi, A.  
DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation.  
*Nat. Cell Biol.*, (2001) 3, 1-7.
- Reit, J., Murray, I., Watt, K., Betney, R., McEwan, J.I.  
The Androgenreceptor interacts with Multiple Regions of the Large Subunit of the General Transkription Factor TFIIIF.  
*J. Biol. Chem.* (2002) 41247-41251.
- Ryan CJ, Small EJ.  
High risk biochemical relapse and the timing of androgen deprivation therapy.  
*J Urol.* 2006 Dec;176(6 Pt 2):S61-5. Review.
- Roos-Mattjus P, Sistonen L.  
The ubiquitin-proteasome pathway.  
*Ann Med.* 2004;36(4):285-95. Review.
- Roy AK, Tyagi RK, Song CS, Lavrovsky Y, Ahn SC, Oh TS, Chatterjee B.  
Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction.  
*Ann N Y Acad Sci.* 2001 Dec;949:44-57. Review.
- van Royen ME, Cunha SM, Brink MC, Mattern KA, Nigg AL, Dubbink HJ, Verschure PJ, Trapman J, Houtsmuller AB.  
Compartmentalization of androgen receptor protein-protein interactions in living cells.  
*J Cell Biol.* 2007 Apr 9;177(1):63-72.
- Salesi N, Carlini P, Ruggeri EM, Ferretti G, Bria E, Cognetti F.  
Prostate cancer: the role of hormonal therapy.  
*J Exp Clin Cancer Res.* 2005 Jun;24(2):175-80. Review.
- Sato N, Kamada N, Muromoto R, Kawai T, Sugiyama K, Watanabe T, Imoto S, Sekine Y, Ohbayashi N, Ishida M, Akira S, Matsuda T.  
Phosphorylation of threonine-265 in Zipper-interacting protein kinase plays an important role in its activity and is induced by IL-6 family cytokines.  
*Immunol Lett.* 2006 Mar 15;103(2):127-34.
- Sato N, Kawai T, Sugiyama K, Muromoto R, Imoto S, Sekine Y, Ishida M, Akira, Matsuda T.  
Physical and functional interactions between STAT3 and ZIP kinase.  
*Int Immunol.* 2005 Dec;17(12):1543-52.
- Sanjo, H., Kawai, T. and Akira, S.  
DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis.  
*J. Biol. Chem.*, (1998) 273, 29066-29071.
- Scheidtmann K.H.  
Dlk/ZIP kinase, a novel Ser/Thr-specific protein kinase with multiple functions  
*Signal Transduction* 2007, Volume 7. 3, 248-259.
- Schwabe, J W., Rhodes, D.:  
Beyond zinc fingers: Steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition.  
*Trends in Biochem.* (1991) 68. 291-296.
- Schwartz MA, Baron V.  
Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections.  
*Curr Opin Cell Biol.* 1999 Apr;11(2):197-202. Review.

- Sells,S.F., Han,S.S., Muthukumar,S., Maddiwar,N., Johnstone,R., Boghaert,E., Gillis,D., Liu,G., Nair,P., Monnig,S. *et al.*  
Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis.  
*Mol.Cell Biol.*, (1997) 17, 3823-3832.
- Sells,S.F., Wood,D.P., Jr., Joshi-Barve,S.S., Muthukumar,S., Jacob,R.J., Crist,S.A., Humphreys,S. and Rangnekar,V.M.  
Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells.  
*Cell Growth Differ.*, (1994) 5, 457-466.
- Sengupta S, Wasyluk B.  
Physiological and pathological consequences of the interactions of the p53 tumor suppressor with the glucocorticoid, androgen, and estrogen receptors.  
*Ann N Y Acad Sci.* 2004 Jun;1024:54-71. Review.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M.  
Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription.  
*Cell.* 2000 Dec 8;103(6):843-52.
- Shang Y, Myers M, Brown M.  
Formation of the androgen receptor transcription complex.  
*Mol Cell.* 2002 Mar;9(3):601-10. Erratum in: *Mol Cell.* 2003 Jun;11(6):1697.
- Shani,G., Marash,L., Gozuacik,D., Bialik,S., Teitelbaum,L., Shohat,G. and Kimchi,A.  
Death-associated protein kinase phosphorylates ZIP kinase, forming a unique kinase hierarchy to activate its cell death functions.  
*Mol.Cell Biol.*, (2004)24, 8611-8626.
- Shank LC, Paschal BM.  
Nuclear transport of steroid hormone receptors.  
*Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2005;15(1):49-73. Review.
- Sheppard, H.M., Harries, J.C., Hussain, S., Bevan, Ch., Heery, D.M.  
Analysis of the steroid receptor coactivator1 (SRC1)-CREB binding protein interface and its importance for the function of SRC1.  
*Mol. Cell. Biol.* (2001) 21(1) 39-50.
- Shohat,G., Shani,G., Eisenstein,M. and Kimchi,A.  
The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases.  
*Biochim.Biophys.Acta*, (2002) 1600, 45-50.
- Shohat,G., Spivak-Kroizman,T., Cohen,O., Bialik,S., Shani,G., Berrisi,H., Eisenstein,M. and Kimchi,A.  
The pro-apoptotic function of death-associated protein kinase is controlled by a unique inhibitory autophosphorylation-based mechanism.  
*J.Biol.Chem.*, (2001) 276, 47460-47467.
- Siddiqui E, Mumtaz FH, Gelister J.  
Understanding prostate cancer.  
*J R Soc Health.* 2004 Sep;124(5):219-21.
- Srinivasan S, Ranga RS, Burikhanov R, Han SS, Chendil D.  
Par-4-dependent apoptosis by the dietary compound withaferin A in prostate cancer cells.  
*Cancer Res.* 2007 Jan 1;67(1):246-53.
- Starcevic M, Dell'Angelica EC.  
Identification of snapin and three novel proteins (BLOS1, BLOS2, and BLOS3/reduced pigmentation) as subunits of biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 (BLOC-1).  
*J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):28393-401.

- Stoyanova R, Hachem P, Hensley H, Khor LY, Mu Z, Hammond ME, Agrawal S, Pollack A.  
Antisense-MDM2 sensitizes LNCaP prostate cancer cells to androgen deprivation, radiation, and the combination in vivo.  
*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Jul 15;68(4):1151-60.
- Sun Z, Pan J, Hope WX, Cohen SN, Balk SP.  
Tumor susceptibility gene 101 protein represses androgen receptor transactivation and interacts with p300.  
*Cancer.* 1999 Aug 15;86(4):689-96.
- Sundquist WI, Schubert HL, Kelly BN, Hill GC, Holton JM, Hill CP.  
Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein.  
*Mol Cell.* 2004 Mar 26;13(6):783-9.
- Syed S, Petrylak DP, Thompson IM.  
Management of high-risk localized prostate cancer: the integration of local and systemic therapy approaches.  
*Urol Oncol.* 2003 May-Jun;21(3):235-43.
- La Thangue NB.  
E2F and the molecular mechanisms of early cell-cycle control.  
*Biochem Soc Trans.* 1996 Feb;24(1):54-9. Review.
- Thomas, T., Voss, A.K., Petrou, P. and Gruss, P.  
The murine gene, *Traube*, is essential for the growth of preimplantation embryos.  
*Dev. Biol.*, (2000) 227, 324-342.
- Tammela T.  
Endocrine treatment of prostate cancer.  
*J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 Nov;92(4):287-95.
- Thomson, S.  
Distinct stimulus-specific histone modifications at Hsp70 chromatin targeted by the transcription factor heatshock factor-1.  
*Mol. Cell* (2004) 15, 585–594
- Trapman J.  
The molecular biology of urological tumors.  
*Prostate Suppl.* 1992;4:159-69. Review.
- Triezenberg, S.J.  
Structure and function of transcriptional activation domains.  
*Curr. Opin. Genet. Dev.* (1995) 5: 190-196  
Tsai, W.Y., Chow, Y.T., Chen, H.R., Huang, K.T., Hong, R.I., Jan, S.P., Kuo, N.Y., Tsao, T.Y.,
- Chen, C.H. and Cheng, S.C.  
Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing.  
*J. Biol. Chem.*, (1999) 274, 9455-9462.
- Tsubaki M, Matsuoka H, Yamamoto C, Kato C, Ogaki M, Satou T, Itoh T, Kusunoki T, Nishida S.  
The protein kinase C inhibitor, H7, inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma via suppression of ERK1/2.  
*Clin Exp Metastasis.* 2007 Jul 18.
- Tzivion G, Shen YH, Zhu J.  
14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding.  
*Oncogene.* 2001 Oct 1;20(44):6331-8. Review.
- Tzivion G, Avruch J.  
14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation.  
*J Biol Chem.* 2002 Feb 1;277(5):3061-4.

- Vagnarelli P, Earnshaw WC.  
Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events.  
*Chromosoma*. 2004 Nov;113(5):211-22. Epub 2004 Sep 4. Review.
- van Royen ME, Cunha SM, Brink MC, Mattern KA, Nigg AL, Dubbink HJ, Verschure PJ, Trapman J, Houtsmuller AB.  
Compartmentalization of androgen receptor protein-protein interactions in living cells.  
*J Cell Biol*. 2007 Apr 9;177(1):63-72.
- Vetterkind S, Boosen M, Scheidtmann KH, Preuss U.  
Ectopic expression of Par-4 leads to induction of apoptosis in CNS tumor cell lines.  
*Int.J.Oncol* (2005) 26: 159-167.
- Vogelzang NJ, Kennealey GT.  
Recent developments in endocrine treatment of prostate cancer.  
*Cancer*. 1992 Aug 15;70(4 Suppl):966-76. Review.
- Wang AH, Kruhlak MJ, Wu J, Bertos NR, Vezmar M, Posner BI, Bazett-Jones DP, Yang XJ.  
Regulation of histone deacetylase 4 by binding of 14-3-3 proteins.  
*Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(18):6904-12.
- Wang Q, Carroll JS, Brown M.  
Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking.  
*Mol Endocrinol*. 2004 Nov;18(11):2633-48.
- Wang, Y.  
Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation.  
*Science* (2004) 306, 279–283
- Wang,Z.G., Ruggero,D., Ronchetti,S., Zhong,S., Gaboli,M., Rivi,R. and Pandolfi,P.P.  
PML is essential for multiple apoptotic pathways.  
*Nat.Genet.*, (1998) 20, 266-272.
- Weber-Nordt RM, Mertelsmann R, Finke J.  
The JAK-STAT pathway: signal transduction involved in proliferation, differentiation and transformation.  
*Leuk Lymphoma*. 1998 Feb;28(5-6):459-67. Review.
- Weigel NL, Moore NL.  
Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action.  
*Nucl Recept Signal*. 2007 May 17;5.
- Williams SK, Tyler JK.  
Transcriptional regulation by chromatin disassembly and reassembly.  
*Curr Opin Genet Dev*. 2007 Apr;17(2):88-93.
- Wilson DP, Sutherland C, Borman MA, Deng JT, Macdonald JA, Walsh MP.  
Integrin-linked kinase is responsible for Ca<sup>2+</sup>-independent myosin diphosphorylation and contraction of vascular smooth muscle.  
*Biochem J*. 2005 Dec 15;392(Pt 3):641-8.
- Wissmann M, Yin N, Muller JM, Greschik H, Fodor BD, Jenuwein T, Vogler C, Schneider R, Gunther T, Buettner R, Metzger E, Schule R.  
Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression.  
*Nat Cell Biol*. 2007 Mar;9(3):347-53.
- Wu RC, Qin J, Yi P, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW.  
Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways.  
*Mol Cell*. 2004 Sep 24;15(6):937-49.

- Wu RC, Feng Q, Lonard DM, O'Malley BW.  
SRC-3 coactivator functional lifetime is regulated by a phospho-dependent ubiquitin time clock.  
*Cell*. 2007 Jun 15;129(6):1125-40.
- Wu TT, Wang JS, Jiaan BP, Yu CC, Tsai JY, Lin JT, Huang JK.  
Role of p21(WAF1) and p27(KIP1) in predicting biochemical recurrence for organ-confined prostate adenocarcinoma.  
*J Chin Med Assoc*. 2007 Jan;70(1):11-5.
- Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H.  
A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors.  
*Nat Struct Biol*. 1996 Jan;3(1):87-94.
- Xie J, Guo Q.  
AATF protects neural cells against oxidative damage induced by amyloid beta-peptide.  
*Neurobiol Dis*. 2004 Jun;16(1):150-7.
- Yamamoto T, Sato N, Sekine Y, Yumioka T, Imoto S, Junicho A, Fuse H, Matsuda T.  
Molecular interactions between STAT3 and protein inhibitor of activated STAT3, and androgen receptor.  
*Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jun 27;306(2):610-5.
- Yamamoto,M., Takahashi,H., Nakamura,T., Hioki,T., Nagayama,S., Ooashi,N., Sun,X., Ishii,T., Kudo,Y., Nakajima-Iijima,S. *et al*  
Developmental changes in distribution of death-associated protein kinase mRNAs.  
*J.Neurosci.Res.*, (1999) 58, 674-683.
- Yanagida M.  
Basic mechanism of eukaryotic chromosome segregation.  
*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Mar 29;360(1455):609-21. Review.
- Yi P, Wu RC, Sandquist J, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, Means AR, O'Malley BW.  
Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1).  
*Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(21):9687-99.
- Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG.  
What is the restriction point?  
*Curr Opin Cell Biol*. 1995 Dec;7(6):835-42. Review.
- Zhang W, Liu HT.  
MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells.  
*Cell Res*. 2002 Mar;12(1):9-18. Review.
- Zhou J, Yao J, Joshi HC.  
Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint.  
*J Cell Sci*. 2002 Sep 15;115(Pt 18):3547-55.

## Veröffentlichungen:

*AATF a novel Coactivator of Androgen Receptor mediated Transcription.*

Leister, P., Burgdorf, S. and Scheidtmann, K. H. *Signal Transduction* 2003 3,18-25.

*TSG101 interacts with apoptosis-antagonizing transcription factor and enhances androgen receptor-mediated transcription by promoting its monoubiquitination.*

Burgdorf, S., Leister, P. and Scheidtmann, K. H., *J. Biol. Chem.* 2004 23,279(17).

*Characterisation of rat BLOS2/Ceap, a putative yeast She3 homolog, as interactionpartner of apoptosis antagonising transcriptionfactor/Che-1.*

Felten, A.<sup>1</sup>, Leister, P.<sup>1</sup>, Uhlmann, L., Burgdorf, S. and Scheidtmann K.H. in press, *Biol. Chem.* Vol.388 jun. 2007

*The Function of Dlk/Zip-Kinase in Androgenreceptor mediated Transcription.*

Leister, P., Imam Chasan, A., and Scheidtmann, K. H. (*in submission*, *Onkogene*)

## Poster und Fachtagungen:

Signaltransduction and Chromatin 2004, Luxemburg

Poster: TSG101 enhances Androgenreceptor mediated transkription by stabelizing its monoubiquitinated status.

Signaltransduction 2006, Luxemburg

Poster: Characterisation of she3-homolog Blos2/Ceap as new Interactionpartner of AATF


Androgens 2006, Cambridge, UK

Poster: A possible Function of Dlk/ZIPK in Androgen mediated transcription.



**Erklärung:**

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.



Peter Leister

Danksagung:

Karl Heinz Scheidtmann danke ich für die überaus gutmütige Betreuung und die konstruktive Kritik beim erstellen dieser Arbeit.

Otto Traub Danke ich für seine schönen Anekdoten und für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Gerd Landsberg danke ich von Herzen, für seinen weisen Rat und seine Hilfe in allen Lebenslagen, die gemeinsamen Erlebnisse und die schönen Jahre. Und natürlich dafür, dass er unseren Laden am laufen hält!

Steve Manderscheid, danke ich für seine Freundschaft und die lustigen Jahre vom Grundstudium bis zum Ende.

Achmet Imam Chasan danke ich für die ZIPK-Mutanten, seine Hilfe beim Klonieren und beim Korrekturlesen, und für seine tolle Kameradschaft.

Andrea Felten danke ich für ihre freundliche Art und die angenehme Zusammenarbeit und die Hilfe beim Korrigieren.

Bei Sarah Appel bedanke ich mich für ihre gruppenübergreifende Kollegialität und die vielen schönen Gespräche und die Hilfe beim Korrekturlesen.