

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting

Die embryonale Entwicklung des äußeren männlichen Genitals:
Identifizierung und funktionelle Analyse von Koregulatoren
des Androgenrezeptors

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Marlene Kunert
aus Schwerin
Lübeck 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Olaf Hiort
 2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Ute Germer
- Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2019
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.04.2019
Promotionskommission der Sektion Medizin

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
I Einleitung	7
1. Die embryonale Geschlechtsentwicklung und die Rolle der Androgene.....	7
1.1 Androgen-unabhängige Prozesse	8
1.2 Androgen-abhängige Prozesse	9
1.3 Die Maus als Tier-Modell für die Androgen-abhängige Entwicklung des äußeren Genitales	11
1.4 Fehlregulationen der AR-Aktivität und seine Folgen	12
2. Der Androgenrezeptor (AR).....	14
2.1 Aufbau des Androgenrezeptors	14
2.2 Molekulare Wirkungsweise des Androgenrezeptors	16
2.2.1 Zusammenspiel des Androgenrezeptors mit seinen Koregulatoren im Zellkern	17
3. Koregulatoren des Androgenrezeptors	18
3.1 Allgemeine Funktionsweise von Koregulatoren	18
3.2 AR-Koregulatoren und ihre bekannte Rolle bei Erkrankungen	24
4. Zielsetzung und Fragestellungen	27
II Materialien und Methoden	28
1. Materialien	28
1.1 Mausembryonen	28
1.2 Hefezellen	28
1.3 Säugerzellen	29
1.3.1 HeLa-Zellen.....	29
1.3.2 COS-1-Zellen	29
1.4 Bakterienzellen.....	29
1.5 Plasmide	29
1.5.1 Yeast-Two-Hybrid-Plasmide für das Yeast-Two-Hybrid-Screening	29
1.5.2 Der AR Expressionsvektor pSVAR0	30
1.5.3 Der Reportervektor (ARE) ₂ -TATA-Luc	30
1.5.4 Der Expressionsvektor phRG-TK.....	30
1.6 Puffer und Gele	30
1.6.1 Puffer für die Immunhistochemie	30
1.6.2 Agarose-Gel	32

1.7 Medien	32
2. Methoden	35
2.1 Herstellung elektrokompenter DH5 α -Zellen	35
2.2 Herstellung der cDNA und das Yeast-Two-Hybrid-System	35
2.2.1 Herstellung der cDNA-Bibliothek	38
2.2.2 Yeast-Two-Hybrid-Screening-Protokoll	40
2.3 Analyse der isolierten Hefeklone	41
2.3.1 Extraktion der Plasmid-DNA aus den Hefekolonien	41
2.3.2 Identifizierung der Klone	42
2.3.2.1 Amplifikation der Inserts aus den Hefepiasmiden durch PCR	42
2.3.2.2 Sequenzierung der PCR-Produkte.....	43
2.3.2.3. Aufreinigung der Sequenzieransätze	45
2.3.2.4 Analyse der Sequenz.....	45
2.3.2.5 Bakterientransformation und Präparation von reiner Plasmid-DNA.....	47
2.3.2.6 Restriktionsverdau der Plasmide zur Identifikation von Mischklonen	47
2.3.2.7 Sequenzierung der Plasmide.....	48
2.4 LiOAc-Transformation der Hefen	49
2.5 Retransformation interessanter Klone in Hefe	50
2.6 Herstellung des Expressionsplasmids p helf3I	50
2.7 Zellkultur mit Säugerzellen und Transaktivierungsassays.....	52
2.7.1 Herstellung von Steroid-freiem fetalen Kälberserum (DCC-FCS).....	52
2.7.2 Medien für die Zellkultur	53
2.7.3 Auftauen und Anziehen der Säugerzellen.....	53
2.7.4 Trypsinieren und Zählen der Säugerzellen	53
2.7.5 Einfrieren der Säugerzellen	54
2.7.6 Transiente Transfektion von Säugerzellen.....	54
2.7.7 Transaktivierungsassays (Dual-Luziferase-Assays).....	54
2.7.7.1 Protokoll Transaktivierungsassay	57
2.8 Immunhistochemie mit dem Antikörper anti-eIF3i	59
III Ergebnisse	63
1. Y-spezifische PCR.....	63

2. Yeast-Two-Hybrid-Screening	63
3. Sequenzierung	64
4. Retransformationen	69
5. Transaktivierungsassays	71
6. EIF3i-Immunhistochemie.....	73
IV Diskussion.....	75
V Zusammenfassung	84
VI Literaturverzeichnis	85
VII Anhang.....	101
VIII Danksagung	110
IX Lebenslauf	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkung von Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) bei der männlichen Genitalentwicklung.....	10
Abbildung 2: Funktionelle Domänen des ARs	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der molekularen Wirkungsweise des ARs	17
Abbildung 4: Funktion von Koregulatoren	18
Abbildung 5: Promotor (ARE) ₂ -TATA	30
Abbildung 6: Das Matchmaker-System in <i>S. cerevisiae</i>	37
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Yeast-Two-Hybrid-Systems	40
Abbildung 8: Amplifikation der Inserts aus den Hefepiasmiden durch PCR.....	43
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Basen-Detektion im Kapillarsequenzierer....	46
Abbildung 10: Restriktionsverdau der Plasmide zur Identifikation von Mischklonen	48
Abbildung 11: Prinzip des Transaktivierungsassays	55
Abbildung 12: Luziferase-Reaktionen	56
Abbildung 13: Anordnung der Verdünnungen des primären Antikörpers auf den Objektträgern.....	61
Abbildung 14: Ergebnis der Y-spezifischen PCR von 16 Gewebeproben des Schwanzes von Mausembryonen des Entwicklungsstadiums E16.....	63
Abbildung 15: Isolierte Klone 54-59 des Yeast-Two-Hybrid-Screenings E16.	64
Abbildung 16: Retransformation von Plasmiden bekannter Koregulatoren.....	69
Abbildung 17: LiOAc-Transformation interessanter Prey-Plasmide.....	70
Abbildung 18: LiOAc-Transformation von eIF3I-Klonen	71
Abbildung 19: Ergebnisse der Versuchsreihe mit dem (ARE) ₂ TATA-Promotor in Cos1-Zellen.....	72
Abbildung 20: Ergebnisse der Versuchsreihe mit dem (ARE) ₂ TATA-Promotor in HeLa-Zellen.....	73
Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung mit dem eIF3i-spezifischen Antikörper anti-eIF3i.	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bereits bekannte AR-Koregulatoren der Yeast-Two-Hybrid-Screenings E15, E16 und E17 (Screening A, B und C).....	67
Tabelle 2: Im Yeast-Two-Hybrid-Screening E16 identifizierte potenzielle AR-Koregulatoren.	69

Abkürzungsverzeichnis

AD	Aktivierungsdomäne
AF-1/-2	activation function-1/-2
AIS	Androgen-Insensitivity-Syndrome (Androgeninsensitivitätssyndrom, Androgenresistenz-Syndrom)
AMH	Anti-Müller-Hormon
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen-responsives Element
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
CAIS	complete AIS (komplette Androgenresistenz)
CTD	c-terminale Domäne
CTE	Carboxyl-terminale Extension
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCC-FCS	Steroid-freies fetales Kälberserum
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
eIF3i	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1
ER	Östrogenrezeptor- α
FCS	fötales Kälberserum
GSN	Gelsolin
GT	genital tubercle, Genitalhöcker
HAT	Histon-Acetylase
HSP	Hitzeschockprotein
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	lysogeny broth
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LiOAc	Lithium-Acetat
MAIS	Milde Androgenresistenz

NCoR	Nuclear receptor co-repressor
NTD	N-terminale Domäne
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal, Kernlokalisierungssignal
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PAIS	Partielle Androgenresistenz
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde
SBMA	Spinobulbäre Muskelatrophie
SDC	synthetic dextrose complete
SHH	Sonic hedgehog
SMRT	Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SOB	super optimal broth
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
T	Testosteron
TDF	testes differentiating factor
u.a.	und andere
UAS	upstream activating sequence
UTR	untranslated region
V	Volt
z. B.	zum Beispiel

I Einleitung

Während der männlichen Sexualentwicklung und der Pubertät spielen neben einer Vielzahl von Genen, Hormonen und ihrer entsprechenden Rezeptoren die männlichen Hormone Testosteron (T) und sein potenterer Metabolit 5- α -Dihydrotestosteron (DHT) eine Schlüsselrolle. Durch die Wirkung dieser beiden Hormone auf ihren spezifischen nukleären Rezeptor, den Androgenrezeptor (AR), wird die Entwicklung in Richtung eines männlichen Phänotyps initiiert.

Der AR liegt in Abwesenheit von Androgenen hauptsächlich im Zytosol in einem Multi-Protein-Komplex vor. Die Bindung seines Liganden führt zu Konformationsänderungen, wodurch sich der AR aus dem zytosolischen Komplex löst und die Translokation in den Kern stattfindet. Im Kern bindet der AR an spezifische Promotoren von Zielgenen und wirkt als Transkriptionsfaktor. Er interagiert dabei mit einer Vielzahl von Koregulatoren, die über verschiedenste Wirkungsweisen regulierend auf die Androgen-abhängige Transkription wirken.

In dieser Arbeit sollen anhand des Maus-Modells mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems Koregulatoren des ARs identifiziert werden. Für das Yeast-Two-Hybrid-System wurde eine cDNA-Bibliothek aus Genitalhöckern von männlichen Mausembryonen generiert. Die verwendeten Genitalhöcker befanden sich im Entwicklungsstadium E16, das heißt in dem Stadium, in dem erste Androgen-abhängige Entwicklungsprozesse im Genitalhöcker stattfinden.

Die Identifizierung von spezifischen Koregulatoren des ARs, die während der embryonalen Genitalentwicklung im Komplex mit dem AR fungieren, könnte die Definition bislang unbekannter möglicher Ursachen für Störungen der Androgen-abhängigen männlichen Genital- und Geschlechtsentwicklung ermöglichen. Sie würde außerdem unser allgemeines Verständnis der Androgen-abhängigen Geschlechtsentwicklung erweitern.

1. Die embryonale Geschlechtsentwicklung und die Rolle der Androgene

Die Geschlechtsentwicklung lässt sich in zwei Prozesse unterteilen. Bei der Geschlechtsdeterminierung entwickelt sich die undifferenzierte Anlage der Gonaden zu Hoden oder Ovarien. Die Geschlechtsdifferenzierung findet statt, wenn sich die Gonade bereits entwickelt hat. Durch Hormone und ihre Rezeptoren kommt es zur Ausprägung des männlichen oder weiblichen Phänotyps.

Im männlichen Embryo lassen sich Androgen-unabhängige und Androgen-abhängige Schritte während der Geschlechtsentwicklung unterscheiden. Androgen-unabhängig bilden sich die bipotente Gonadenanlage und der Genitalhöcker als Vorstufe der äußeren Genitale, während sich Androgen-abhängig im Anschluss die Maskulinisierung der inneren und äußeren Genitale vollzieht.

1.1 Androgen-unabhängige Prozesse

Bei der Bildung der bipotenten Gonadenanlage spielen die Gene *WT1* (Wilms' tumor 1), *SF1/NR5A1* (steroidogenetic factor 1/nuclear receptor subfamily 5 group A member 1), *CBX2/M33* (chromobox homolog 1), *LHX9* (LIM homeobox 9) und *EMX2* (empty spiracles homeobox 2) eine entscheidende Rolle. Entsprechende Knock-out-Mausstämme weisen keine Gonaden auf (Eggers & Sinclair, 2012).

Bei einem XY-Karyotyp bewirkt die Expression des *SRY*-Gens (sex-determining region of the Y-chromosome) in der bipotenten Gonadenanlage (zum Entwicklungsstadium E10.5 im Mausembryo), dass sich die Gonadenanlage in Richtung Hoden entwickelt (Eggers & Sinclair, 2012). Unter dem Einfluss des entsprechenden Proteins, eines Transkriptionsfaktors, der auch testes differentiating factor (TDF) genannt wird, differenzieren sich Bindegewebszellen zu Sertoli-Zellen (Wilson et al., 2007; Carré & Greenfeld, 2017). Diese produzieren das Anti-Müller-Hormon (AMH), welches den Abbau der Müller'schen Gänge induziert, die sich im weiblichen Embryo zu Uterus und Tuben differenzieren (Wilhelm et al., 2007; Dietrich & Holzgreve, 2007; Mittwoch, 2000).

Das Protein SRY induziert die vermehrte Expression von *SOX9* (SRY related homeobox protein 9), wodurch wiederum die Produktion von *FGF9* (fibroblast growth factor 9) stimuliert wird. *FGF9* und *SOX9* agieren in einem positivem Rückkopplungsmechanismus, welcher die Expression von Genen unterdrückt, die zur Entwicklung in Richtung eines weiblichen Phänotyps führen, hier besonders *WNT4* (wingless-type MMTV integration site family, member 4). Für die Entwicklung in Richtung Hoden ist das Zusammenspiel vieler weiterer Gene notwendig. Zu nennen wären hier *GATA4* (GATA binding protein 4), *FOG2* (Zinc finger protein multitype 2), *WT1*, *SF1/NR5A1*, *Ptgds* (Prostaglandin-D synthase), *Fgfr1* (Fibroblast growth factor receptor 1), *CBX2* (Chromobox homolog 2), *SOX8* (SRY-related HMG box 8), *DAX1* (dosage-sensitive sex-reversal, adrenal

hyperplasia congenital X chromosome 1) und *DHH* (desert hedgehog) (Eggers & Sinclair, 2012; Ohnesorg et al., 2014).

Zeitgleich zur Expression von *SRY* in der bipotenten Gonadenanlage bildet sich die Anlage des äußeren Genitals durch eine Verdichtung des Mesenchyms. Es bilden sich die Kloakenfalten, die sich vor der Kloakenmembran vereinigen und so den sogenannten Genitalhöcker formen (Sadler, 2003). Eine erste Vorwölbung ist bei der Maus im Entwicklungsstadium E10.5 zu sehen (Harada et al., 2015). In der frühen Phase der Ausbildung des Genitalhöckers spielen vor allem Wachstumsfaktoren wie FGF 8 (fibroblast growth factor 8), SHH (sonic hedge-hog), BMP (bone morphogenetic protein), TGF (transforming growth factor) und der Wnt/CTNNB (wingless-related MMTV integration/beta-catenin)-Signalweg eine wichtige Rolle (Ipulan et al., 2014). Miyagawa et al. zeigten beispielsweise, dass eine lokal induzierte Herunterregulierung der Expression von Beta-Catenin im männlichen Genitalhöcker der Maus zu einer verminderten Virilisierung des Genitales führt (Miyagawa et al., 2009).

1.2 Androgen-abhängige Prozesse

Die Maskulinisierung der inneren und äußeren Genitalien ist strikt Androgen-abhängig und beginnt im menschlichen Embryo ca. 9 Wochen nach der Befruchtung, wenn in den Leydig-Zellen der fetalen Hoden Testosteron produziert und sezerniert wird (Siiteri & Wilson, 1974). Das Testosteron wirkt lokal auf die Wolff-Gänge, die den AR exprimieren (Hannema & Hughes, 2006). Es verhindert die Degeneration der Wolff-Gänge und fördert dessen Differenzierung zu Vas deferens, Nebenhoden und Samenblase (Hannema et al., 2006).

Nach Diffusion im Blut induziert Testosteron die Differenzierung der äußeren Genitalien, die Morphogenese der Prostata und den Deszensus der Hoden. Da die Konzentration von Testosteron im fetalen Kreislauf relativ niedrig ist, exprimieren die Zielzellen der externen Genitalien und der Prostata das Enzym 5 α -Reduktase Typ II, welches Testosteron in Dihydrotestosteron (DHT) umwandelt. DHT hat eine deutlich höhere Affinität zum AR und weist ein 10-fach höheres Transaktivierungspotential auf (Deslypere et al., 1992).

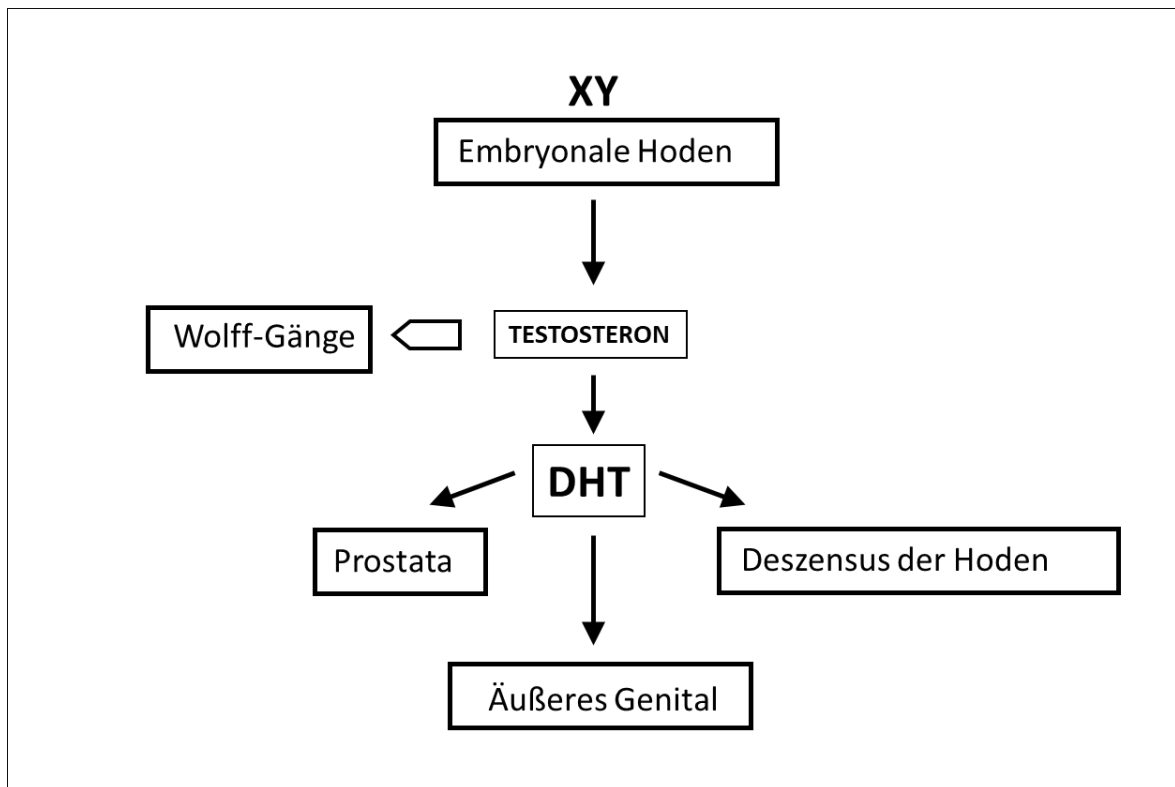


Abbildung 1: Wirkung von Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) bei der männlichen Genitalentwicklung

Testosteron verhindert die Degeneration der Wolff-Gänge, während sein potenterer Metabolit Dihydrotestosteron (DHT) auf die Differenzierung des äußeren Genitales, die Morphogenese der Prostata und den Deszensus der Hoden wirkt.

Die Anlagen der äußeren Genitalien bestehen aus dem Genitalhöcker und den Genitalwülsten. Unter dem Einfluss der Androgene verlängert sich der Genitalhöcker mehr und mehr und zieht hierbei die Urethralfalten so nach vorn, dass sie die seitlichen Wände der tiefen Urethralgrube bilden. Am Ende des 3. Monats schließen sich die Urethralfalten und bilden somit den proximalen Teil der Urethra. Der distale Abschnitt der männlichen Urethra entsteht später durch Einwanderung von Ektodermzellen. Hieraus entsteht eine Urethralplatte, die kanalisiert und schließlich den Ausgang der Urethra, das Ostium urethrae, an der Spitze der Glans bildet. Die Genitalwülste befinden sich zunächst noch in der Leistenregion, wandern aber im Laufe der Androgen-abhängigen Entwicklung immer weiter nach kaudal. Es kommt zu einer Migration und Fusion beider Wülste zum Skrotum (Sadler, 2003; Yamada et al., 2003).

In der 10.-12. Woche nach Befruchtung beginnt ausgehend vom Urogenitalsinus die Morphogenese der Prostata durch eine epitheliale Knospung. Eine Expression

des ARs in der sich entwickelnden Prostata konnte in Gewebeproben des Entwicklungsstadiums E18 bis E22 nachgewiesen werden (Aumüller et al., 1998). Da der AR zu Beginn nur im umgebenden Mesenchym der Prostata exprimiert wird, scheinen Androgen-abhängige parakrine Signale zwischen Epithel und Mesenchym von großer Bedeutung für die Prostata-Entwicklung zu sein.

Der Hodendeszensus vom Ursprung der Urogenitalleiste bis ins Skrotum beginnt 10 Wochen nach Befruchtung und wird in zwei Phasen unterteilt (Nef & Parada, 2000). Die transabdominale Phase wird hauptsächlich durch das Peptidhormon Insulin-like 3 hormone (Insl3), welches von den Leydig-Zellen sekretiert wird, vermittelt (Wilson & Davies, 2007). Die zweite, inguinokrotale Phase, die in Woche 26-35 stattfindet (Hughes & Acerini, 2008), wird in erster Linie über den AR reguliert. Bisher ist unklar, ob Androgene den Hodendeszensus direkt durch Wirkung auf das Gubernaculum testis (Hodenleitband) induzieren. Es wurde gezeigt, dass der AR im Hodenleitband von Schweinen nur wenig exprimiert wird und Testosteron scheint dort nur in geringem Maße in DHT umgewandelt zu werden (Heyns & Pape, 1991; Heyns et al., 1993). In Ratten beeinflussen Androgene die männliche Entwicklung des Nervus genitofemoralis, der unter anderem den Hodensack sensibel versorgt. Dieser Nerv sekretiert das Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), welches für die Morphogenese und Migration des Hodenleitbandes essentiell ist (Ng et al., 2005; Yong et al., 2008). Ob diese Ergebnisse auf den menschlichen Embryo zu übertragen sind, bleibt zu klären.

1.3 Die Maus als Tier-Modell für die Androgen-abhängige Entwicklung des äußeren Genitales

Experimente mit menschlichen Embryonen sind grundsätzlich ethisch schwer vertretbar, so dass hauptsächlich genetische Analysen von Patienten mit Störungen der Geschlechtsentwicklung zu einem besseren Verständnis der männlichen Genitalentwicklung geführt haben. Seit Jahren wird die Entwicklung der Genitale am Maus-Modell untersucht (Miyagawa et al., 2009; 2011). Hierdurch konnten viele Ergebnisse aus den Untersuchungen der Patienten mit AIS (Androgeninsensitivitätssyndrom bzw. Androgenresistenz) bestätigt werden.

Besonders die Gruppe um Gen Yamada konnte mit Untersuchungen an Mäusen entscheidende neue Erkenntnisse über Androgen-abhängige Prozesse im Genital-

höcker gewinnen. Bereits 2002 hat die Gruppe eine genaue morphologische Untersuchung der männlichen und weiblichen Genitalhöcker der Maus durchgeführt. Im Elektronenmikroskop war eine Unterscheidung zwischen männlichem und weiblichem Genitalhöcker erst 16,5 Tage nach der Befruchtung (E16.5) möglich (Suzuki et al. 2002). Die Forschergruppe führte außerdem Experimente durch, in denen sie Mausembryonen in verschiedenen Entwicklungsstufen in utero mit Antiandrogenen behandelte. Sie konnten so zeigen, dass entscheidende Androgen-abhängige Vorgänge im männlichen Genitalhöcker bereits um E15.5 stattfinden. Der AR wird in diesem Stadium sowohl im Mesenchym als auch im Epithel der Urethralplatte exprimiert (Miyagawa et al., 2009).

Als entscheidender Unterschied zum Menschen entwickelt sich im distalen Teil des Penis' der Maus ein Knochen. Dessen Ausbildung ist sowohl Androgen-abhängig als auch von Interaktionen zwischen Mesenchym und Epithel beeinflusst (Yamada et al., 2003).

1.4 Fehlregulationen der AR-Aktivität und seine Folgen

Bei Fehlregulationen der AR-Aktivität kann es zu einer gestörten Geschlechtsentwicklung kommen und somit ist eine normale Entwicklung der inneren und äußeren männlichen genitalen Strukturen eines 46,XY Individuums nicht möglich.

Wie anfällig embryonale Entwicklungsprozesse im Genitale für Störungen sind, macht z. B. die große Häufigkeit von Hypospadien bei Neugeborenen deutlich. Unter einer Hypospadie versteht man eine abnorme Öffnung bzw. Mündung der männlichen Harnröhre an der Unterseite des Penis' (Yamada et al., 2003), die aus Störungen bei der Anordnung oder Fusion der Urethralfalten entstehen kann. Es handelt sich um eine Entwicklungsstörung, die auf das Genital beschränkt ist und innerhalb eines kurzen Zeitraumes während der Embryonalentwicklung entstehen kann. Dieser urogenitale Defekt wird bei etwa 0,3% der neugeborenen Jungen diagnostiziert (Sigel, 2007).

Können Androgene hingegen im gesamten Organismus und ohne zeitliche Einschränkung ihre Wirkung über den AR nicht oder nur teilweise ausüben, spricht man von einer Androgenresistenz oder dem Androgeninsensitivitätssyndrom (AIS). Patienten mit AIS sind genetisch männlich und können Androgene

prinzipiell in ausreichender Menge bilden, weisen aber ein teilweise bis vollständig weiblich aussehendes Genital auf. Man unterscheidet drei Formen des AIS: das komplette AIS (CAIS), das partielle AIS (PAIS) und das minimale AIS (MAIS). Patienten mit CAIS haben eine weibliche Geschlechtsidentität und ein weibliches äußeres Erscheinungsbild. Da das Gewebe der äußeren Genitalien nicht auf die produzierten Androgene ansprechen kann, geht die Entwicklung in Richtung weiblicher äußerer Geschlechtsmerkmale. Die Hoden befinden sich entweder in den großen Schamlippen, sind inguinal palpabel oder liegen intraabdominal und sind so für die klinische Untersuchung nicht zugänglich. Es fehlen die von den Wolff-Gängen abgeleiteten Strukturen, die Prostata, das Scham- und Achselhaar und die Nebenhoden (Quigley et al. 1995). Durch die Bildung des Anti-Müller-Hormons (AMH) kommt es zur Rückbildung der Müller-Gänge, so dass Uterus und Tuben nicht existieren und die Vagina blind endet (Sadler, 2003). Das klinische Bild von Patienten mit PAIS ist nicht eindeutig einem männlichen oder weiblichen Phänotyp zuzuordnen. Selbst bei bekanntem AR-Genotyp ist der Phänotyp sehr variabel (Deeb et al., 2005). Mögliche Symptome bei PAIS-Patienten sind Gynäkomastie, Hypospadie, Mikropenis, Azoospermie oder Lageveränderung der Hoden (Holterhus et al., 2000; Werner et al., 2010). Individuen mit MAIS zeigen zumeist einen unauffälligen männlichen Phänotyp, so dass die Erkrankung in der Kindheit meist unbemerkt bleibt. Symptome können Unfruchtbarkeit, Gynäkomastie oder eine verminderte Bart- und Körper-Behaarung sein.

Als Ursachen für das AIS sind bislang hunderte Mutationen im AR-Gen identifiziert worden, die in AIS-Patienten detektiert wurden und in der AR-Database (www.androgendb.mcgill.ca) registriert sind. Bei nahezu allen Patienten mit CAIS, doch nur bei 28-73% (je nach Selektion) der Fälle von Patienten mit PAIS, kann ein Defekt im Gen des ARs nachgewiesen werden (Jääskeläinen, 2012). Schwer detektierbare Splice-Site-Mutationen oder Mutationen in der 5'-UTR (untranslated region) können in einigen Fällen erklären, warum trotz klinischer Androgenresistenz keine Mutation im AR-Leserahmen bei PAIS-Patienten nachgewiesen werden konnte. Bei einem PAIS-Patienten konnte eine stille Mutation im Exon 8 des ARs detektiert werden, welche zu einem veränderten Splicing führte (Hellwinkel, 2001), in anderen Patienten wurde eine Repression der AR-

Translation durch einen uORF (upstream open reading frame) in der 5'UTR des ARs nachgewiesen (Hornig et al., 2016).

Zur Diskussion steht, ob molekulare Defekte in einem Koregulator des ARs Ursache für den AIS-Phänotyp sein könnten. Hierauf wird im nächsten Kapitel ausführlicher eingegangen.

2. Der Androgenrezeptor (AR)

Der AR (AR, OMIM *313700) wird der Gruppe der Steroidhormonrezeptoren zugeordnet. Diese Gruppe unterteilt sich in die Sexualsteroidrezeptoren (Östrogenrezeptor- α (ER- α), Östrogenrezeptor- β (ER- β), Progesteronrezeptor und AR), den Glukokortikoidrezeptor (Bedeutung im Glukose-Metabolismus und in der Stress-Antwort des Körpers) und den Mineralokortikoidrezeptor (dient der Regulation des Wasser- und Salzhaushalts).

2.1 Aufbau des Androgenrezeptors

Der AR ist ein Protein von 110 kDA, das sich aus 910-920 Aminosäuren zusammensetzt (Claessens et al., 2008). Die Länge des Proteins ist variabel, da innerhalb der aminoterminalen Transaktivierungsdomäne zwei polymorphe Trinukleotidwiederholungen lokalisiert sind. Zum 5'-Ende der N-terminalen Domäne (NTD) finden sich 9-36 Glutamin-Repeats, zum 3'-Ende 10-27 Glycin-Repeats (Quigley et al., 1995; Röpke et al., 2004).

Der AR gliedert sich in vier verschiedene Domänen: eine große NTD, die zentral gelegene DNA-Bindungsdomäne (DBD), die kurze Hinge-Region und die Liganden-Bindungsdomäne (LBD).

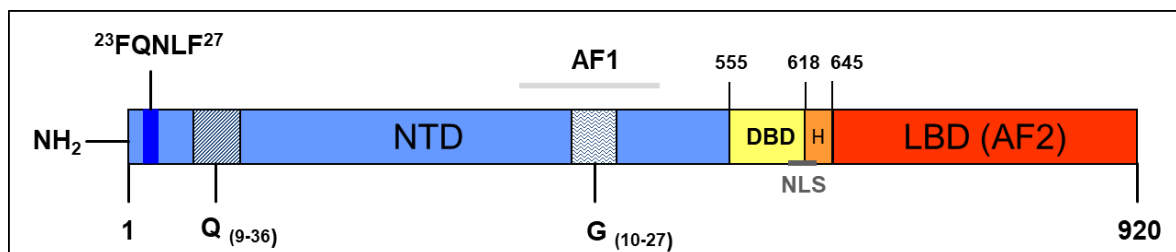


Abbildung 2: Funktionelle Domänen des ARs (modifiziert nach Claessens et al., 2008)

Dargestellt sind die N-terminale Domäne (NTD), die AF1 (activation function 1), die DNA-bindende Domäne (DBD), die Hinge-Region (H) mit dem Kernlokalisierungssignal (NLS) und die Liganden-bindende Domäne (LBD). Zusätzlich finden sich am 5'-Ende der NTD die Glutamin-Repeats und zum 3'-Ende die Glycin-Repeats. Des Weiteren ist das FQNLF-Bindungsmotiv am N-terminalen Ende innerhalb der NTD dargestellt.

Die NTD ist eine wenig strukturierte Domäne des ARs. Erst durch die Bindung von Proteinen, die die Transkription regulieren, nimmt sie eine organisiertere Konformation an (Trapman & Dubbink, 2007). Sie weist eine starke Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion, activation function 1 (AF1) auf. Jenster et al. (Jenster et al., 1995) definierten zwei Transkriptions-Aktivierungs-Einheiten innerhalb der AF1, Tau-1 (transcription activation unit 1) und Tau-5 (transcription activation unit 5). Tau-5 ist ein Fragment der AF1, welches auch in Abwesenheit der LBD ihr Aktivierungspotential behält, während Tau-1 abhängiger von der Präsenz der LBD ist (Claessens et al., 2008). Am 5'-Ende der NTD findet sich ein ²³FQNLF²⁷-Motiv, welches mit der C-terminalen LBD interagieren kann (van de Wijngaart et al., 2012).

Die hoch konservierte DBD gliedert sich in zwei Zink-Finger-Motive, in denen jeweils ein zentrales Zn²⁺ vier Cystein-Seitenketten koordiniert. Das erste Zink-Finger-Motiv beinhaltet eine kleine α -helikale Struktur, die sogenannte Proximal box (P-Box), über die der Kontakt zu den Androgen-responsiven Elementen (AREs) in Promotoren von Zielgenen aufgebaut wird. Das zweite Zink-Finger-Motiv enthält die sogenannte Distal box (D-Box), die in die DNA-abhängige Dimerisierung involviert ist (Claessens et al., 2008; Heemers & Tindall, 2007). Am C-terminalen Ende findet sich eine Kernlokalisierungssequenz (NLS), die für die Vermittlung des Transportes des ARs in den Zellkern verantwortlich ist. Die DBD des ARs ist in der Lage, an zwei verschiedene Arten von AREs zu binden. Klassische AREs bestehen aus palindromischen Sequenzen. Dies sind kurze invertierte DNA-Sequenzwiederholungen, die auf beiden Strängen in eine Richtung gelesen die gleiche Basenfolge zeigen. Steroidrezeptoren wie der AR erkennen mit hoher Affinität die von zwei Hexameren gebildete palindromische Sequenz 5'GGTACAnnnTCTTCT-3' (Trapman & Dubbink, 2007). Selektive AREs (sAREs) bestehen aus partiellen direkten Wiederholungen des Hexamers 5'-AGAACA-3' und werden im Gegensatz zu den klassischen AREs nicht vom GR erkannt (Claessens et al., 2008).

Die Hinge-Region ist ein flexibles Bindungsstück zwischen der DBD und der C-terminalen LBD. Sie beinhaltet eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) (Matsumoto et al., 2013).

Die LBD ist eine hochstrukturierte Domäne, in der sich 11 α -Helices (H1-H12, H2 existiert nicht) unterscheiden lassen, die zusammen mit vier kleinen β -Strängen die Struktur eines dreilagigen Sandwiches annehmen (Matias et al., 2000). Die Konformationsänderung der 12. Helix ist essentiell für die Bindung der Liganden Testosteron und DHT. Nach Bindung des Liganden kommt es zu einem starken Konformationswechsel, bei der Helix 12 die zentral gelegene Liganden-Bindungstasche verschließt und sich an der Oberfläche ein hydrophober Spalt, die sogenannte Kofaktor-Bindungsgrube oder Activation-function 2 (AF2), bildet (Moras & Gronemeyer, 1998).

2.2 Molekulare Wirkungsweise des Androgenrezeptors

Der AR liegt in Abwesenheit seines Liganden inaktiv in einem Multi-Protein-Komplex im Zytoplasma vor. Dieser dynamische Multi-Protein-Komplex beinhaltet Chaperone und Co-Chaperone wie z. B. Hsp90 (Heat shock protein 90), Hsp70 (Heat shock protein 70), p23 und FKBP51/FKBP52 (FK506 binding protein of 51kDa/52kDa) (Yong et al., 2006; Cano et al., 2013). Nach Bindung des Liganden bildet sich die AF2 in der LBD aus und interagiert mit dem $^{23}\text{FQNLF}^{27}$ -Motiv am N-Terminus des ARs. Diese N/C-terminale Interaktion ist von großer Bedeutung für die Funktion des ARs in vivo (Claessens et al., 2008). Es senkt die Androgen-dissoziationsrate und verhindert den Abbau des AR-Proteins (He et al., 2002; Dubbink et al., 2004). Durch die N/C-Interaktion lösen sich die assoziierten Proteine und der Hormonrezeptorkomplex wandert vermittelt durch Importin- α und die Kernlokalisationssequenz in den Zellkern (Cutress et al., 2008). Dort bindet der AR als Homodimer in einer Kopf-an-Kopf-Konformation an Androgen-responsive Elemente (AREs) seiner Zielgene. Es werden Koregulatorproteine rekrutiert und im Komplex mit der RNA-Polymerase II kommt es schlussendlich zur Transkription der Zielgene (Heemers & Tindall, 2007; Trapmann & Dubbink, 2007; Glass & Rosenfeld, 2007) (siehe Abbildung 3).

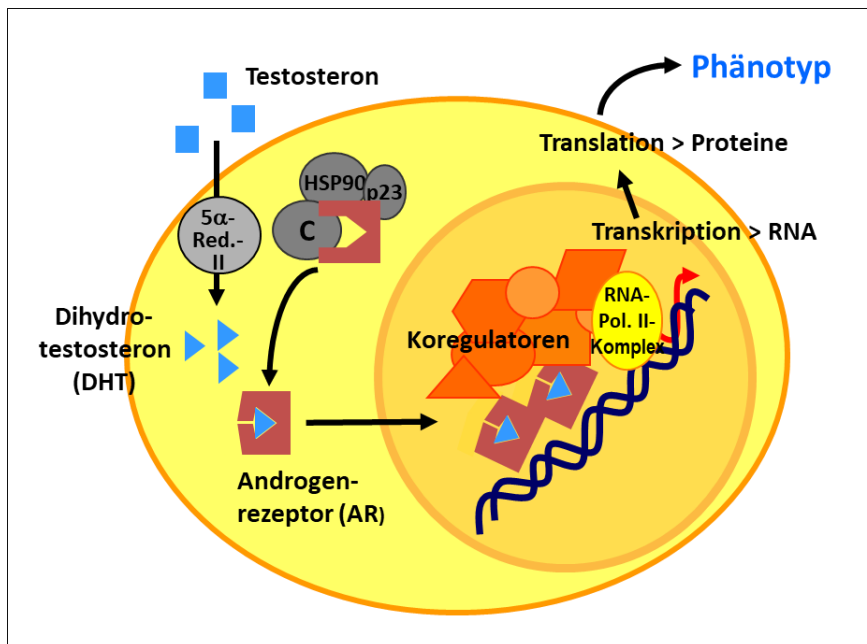


Abbildung 3: Schematische Darstellung der molekularen Wirkungsweise des ARs (modifiziert nach Lee & Chang, 2003)

Ohne seinen Liganden T oder DHT liegt der AR inaktiv an Hitzeschockproteine und weitere Proteine im Komplex gebunden im Zytoplasma vor. Nach Bindung des Liganden dissoziiert der Proteinkomplex und der AR wandert in den Zellkern. Dort erfolgt nach Rezeptordimerisierung die Bindung an AREs in der Promotorregion von Zielgenen. Nun werden diverse Koregulatoren rekrutiert und die Transkription der Zielgene wird initiiert. Es kommt zur Ausprägung des entsprechenden Phänotyps.

2.2.1 Zusammenspiel des Androgenrezeptors mit seinen Koregulatoren im Zellkern

Im Zellkern bindet der AR an die Promotoren seiner Zielgene. Die N/C-terminale Interaktion wird hierbei gelöst, so dass die NTD und LBD des ARs mit koregulatorischen Proteinen interagieren können (van Royen et al., 2007). Der AR interagiert über seine LBD mit LxxLL-Motiven in Koregulatoren. Im Gegensatz zu anderen nukleären Rezeptoren kann die AF2 des ARs zusätzlich mit FxxLF-, FxxFF- und FxxMF-Motiven innerhalb von Koregulatoren stärkere Bindungen eingehen (van de Wijngaart et al, 2006; He et al., 2002; Hur et al., 2004). Die besondere Eigenschaft des ARs, die FxxLF-Motive stärker als die LxxLL-Motive zu binden, erklärt sich zum einen aus der Konformation der AF2 an sich, da die tiefe AF2-Bindungsgrube die Aufnahme großer Phenylalanin-Seitenketten ermöglicht. Zum anderen wird die Interaktion zusätzlich durch flankierende Aminosäuren, die elektrostatische Wechselwirkungen mit dem FxxLF-Motiv ausbilden, unterstützt (Claessens et al., 2008; Dubbink et al., 2004).

3. Koregulatoren des Androgenrezeptors

3.1 Allgemeine Funktionsweise von Koregulatoren

Bislang wurden über 450 AR-Koregulatoren identifiziert (Stashi et al., 2014) (<http://androgendb.mcgill.ca/ARinteract.pdf>, letzter Zugriff 17.05.2018). Die meisten dieser Koregulatoren wurden aus Prostata-Karzinom- oder Hoden-Gewebe isoliert und nehmen ebenfalls Einfluss auf andere nukleäre Rezeptoren (www.nursa.org). Koregulatoren des ARs wirken entweder aktivierend oder reprimierend auf die Genexpression (Lonard & O'Malley, 2012; Millard et al., 2013) und unterscheiden sich von Transkriptionsfaktoren darin, dass sie typischerweise nicht an die DNA binden und nicht die Basalrate der Transkription beeinflussen. Vielmehr nehmen sie Einfluss auf die AR-vermittelte Transkription, indem sie auf den AR selbst, auf die basale Transkriptionsmaschinerie im Komplex mit der RNA-Polymerase II oder auf die Promotor-Region und das Chromatin von Zielgenen wirken (Millard et al., 2013; Pihlajamaa et al., 2015; Heemers & Tindall, 2007) (siehe Abbildung 4).

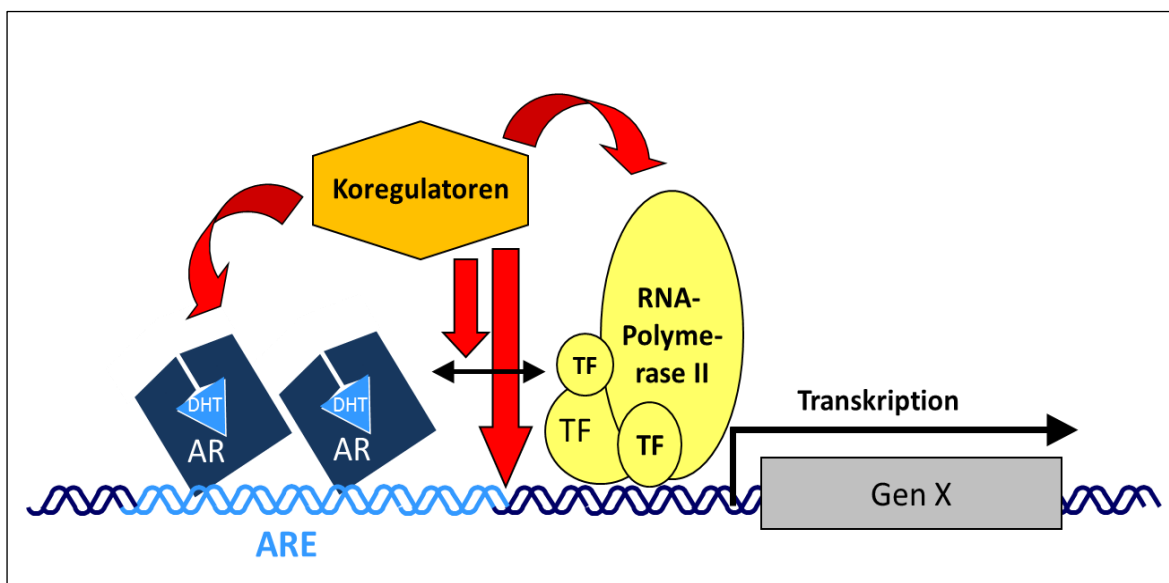


Abbildung 4: Funktion von Koregulatoren (modifiziert nach Heemers & Tindall, 2007)

Koregulatoren des ARs wirken entweder auf den AR selbst, auf die basale Transkriptionsmaschinerie im Komplex mit der RNA-Polymerase II oder auf die Promotor-Region von Zielgenen.

AR-Koregulatoren sind zumeist Teil großer Multi-Protein-Komplexe und nehmen an zahlreichen, verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen teil. Sie können vielfältige enzymatische Aktivitäten auf Histone, andere Koregulatoren oder den

Rezeptor selbst ausüben, die zu posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung oder ADP-Ribosylierung führen. Die hohe Komplexität dieser enzymatischen Aktivitäten erlaubt eine präzise zeitliche und räumliche Regulation des Androgen-abhängigen Transkriptionsprozesses. Durch eine differenzierte Expression und Aktivierung der Vielzahl von Koregulatoren ist es möglich, dass ein einziges Signal, das Androgen, in verschiedenen Geweben und verschiedenen Zelltypen ganz unterschiedliche zelluläre Antworten auslöst und zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Androgen-abhängige Transkriptionsprofile induziert werden können (Bebermeier et al., 2006). Der Versuch, eine exakte Einteilung der AR-Koregulatoren zu finden, ist äußerst komplex, auch, weil klassische Koregulatoren des ARs wie der Koaktivator SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1) oder die NCoR/SMRT-Komplexe (Nuclear Receptor Co-Repressor/Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) unter bestimmten Bedingungen entgegengesetzte Funktionen ausüben können. Das heißt, dass SRC1 auch als Repressor und NCoR/SMRT-Komplexe auch als Aktivatoren wirken können (Millard et al., 2013). Ein Switch der Funktion von Korepressor zu Koaktivator oder anders herum ist z. B. abhängig vom Zelltyp, also von der zellulären Zusammensetzung. So kann der SMRT-Komplex im Östrogenrezeptor- α (ER- α) als Koaktivator in HeLa- und MCF-Zellen fungieren, während er in HepG2-Zellen wieder seine bekannte Korepressor-Funktion einnimmt (Peterson et al., 2007).

Im Folgenden werden einige Wirkungsweisen von AR-Koregulatoren und Beispiele für Koaktivatoren und Korepressoren des ARs näher beschrieben.

Viele der bislang identifizierten AR-Koregulatoren beeinflussen die Struktur und Organisation des Chromatins. Die Basisstruktur des Chromatins sind die Nukleosomen, die aus ca. 200 DNA-Basenpaaren bestehen, die wiederum um einen Histonen-Oktamer-Komplex gewickelt sind. Struktur, Position und Eigenschaft der Nukleosomen regulieren die Genexpression (Trapman & Dubbink, 2007; Heemers & Tindall, 2007; O'Malley et al., 2008; van de Wijngaart et al. 2012).

Koregulatoren können beim sogenannten Chromatin-Remodeling entweder ATP-abhängig auf die Position und Struktur von Nukleosomen einwirken oder das Chromatin durch posttranslationale Modifikationen von Histonen beeinflussen.

ATP-abhängige Chromatin-Remodeling-Komplexe bestehen typischerweise aus einer katalytischen Untereinheit, die zur SNF2-Familie der ATPasen, normalerweise BRG1 (auch: SMARCA4) oder BRM (auch: SMARCA2), gehören und 10-12 BRG1-associated factors (BAFs). Beispiele für solche Chromatin-Remodeling-Komplexe sind der SWI/SNF (switching/sucrose nonfermenting)-, der WINAC- oder der NUMAC-Komplex. Diese Komplexe nutzen die abgeleitete Energie aus der ATP-Hydrolyse und bewirken eine Auflockerung des Chromatins, also eine geringere Bindung zwischen Nukleosomen und DNA. Dadurch wird die DNA erreichbar für DNA-bindende Proteine (Polymerasen und Transkriptionsfaktoren) und die Transkription wird ermöglicht (van de Wijngaart et al., 2012). ARIP4 (AR-interacting protein 4) ist z. B. eine nukleäre ATPase, die als Koaktivator mit der Zinkfinger-Region des ARs interagiert und so die AR-abhängige Transaktivierung in Kotransfektionsexperimenten stimuliert (Rouleau et al., 2002). BRG1 (Brahma-related gene 1) und hBRM (human homolog of Drosophila brm gene), zwei Kernkomponenten, die vom SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplex für die Repositionierung der Nukleosomen rekrutiert werden, sind ebenfalls AR-Koaktivatoren (Matsumoto et al., 2013). BAF57 (BRG1-associated factor 57) ist abhängig von der SWI/SNF-ATPase-Aktivität und kooperiert mit anderen Koaktivatoren wie SRC-1 und Ubc9 (Ubiquitin carrier protein 9). Es bindet an die AR-DBD-Hinge Region (Link et al., 2005). BAF60a, eine weitere Untereinheit des SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplexes, interagiert mit dem AR hormonabhängig über ein FxxFF-Motiv (van de Wijngaart et al., 2009).

Histon-Acetyltransferasen (HATs) modifizieren Histone durch Hinzufügen einer Acetylgruppe an spezifischen Lysinresten, wodurch es zur Auflösung der Nukleosomenstruktur kommt. Die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren an die entsprechende DNA-Bindungsseite wird ermöglicht und so kommt es zur Aktivierung der Transkription (Heemers & Tindall, 2007; van de Wijngaart et al., 2012; Matsumoto et al., 2013). Beispiele für Proteine mit HAT-Aktivität sind zwei Mitglieder der p160-SRC-Genfamilie SRC-1 (auch: NCoA-1) und SRC-3 (auch: NCoA-3, p300/CBP interacting protein (p/CIP) oder AIB1 (amplified in breast

cancer-1)). SRC-1 war in den 90er Jahren der erste Koaktivator des ARs, der beschrieben wurde (Onate et al., 1995). SRC-1 und SRC-3 interagieren direkt und Liganden-abhängig mit dem AR, um die AR-vermittelte Transkription zu erhöhen. Mitglieder der p160-Familie beinhalten drei zentrale LxxLL-Motive, mit denen sie über die AF2 der LBD mit dem AR interagieren können (Bulyanko & O'Malley, 2010; Lonard & O'Malley, 2012; Dasgupta et al., 2014). Neben der HAT-Aktivität interagieren die Mitglieder der SRC-Familie mit anderen agonistisch gebundenen Rezeptoren, mit Koaktivatoren wie CBP (CREB-binding Protein) oder p300, mit anderen HATs wie p/CAF (p300/CBP-associated factor) und mit einigen Transkriptionsfaktoren wie TBP (TATA-box binding protein) und TFIIB (Transkriptionsfaktor IIB). Sie sind in nahezu alle Phasen der Genexpression involviert wie Transkriptionsinitiation, Kofaktor-Rekrutierung, Elongation, RNA-Splicing, posttranslationale Modifikationen von nukleären Rezeptoren oder Koregulatoren (Xu et al., 1998; Stashi et al., 2014; Dasgupta et al., 2014). Im Gegensatz zu den HATs kommt es durch Histon-Deacetylasen (DHATs) mittels einer Deacetylierung zu einer Unterdrückung der Transkription durch Wiederherstellung der kondensierten Nukleosomenstruktur (Heemers & Tindall, 2007). Die Methylierung von Histon-Seitenketten an Lysin- oder Arginin-Residuen kann eine Aktivierung oder eine Reprimierung der Transkription zur Folge haben, je nachdem an welcher Position diese sich vollzieht (Matsumoto et al., 2013). CARM-1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase-1) methyliert z. B. Arginin 17 von Histon 3 und ist in der Lage, mit SRC-Koaktivatoren zu interagieren (Heemers & Tindall, 2007; Trapmann & Dubbink, 2007). Eine weitere posttranslationale Modifikation ist die Ubiquitinierung. Hierbei wird ein 76 Aminosäuren langes Polypeptid, das Ubiquitin, an Lysine von Zielgenen angehängt (Matsumoto et al., 2013). Für die Ubiquitinierung sind das aktivierende E1 Enzym, das konjugierende E2 Enzym und die E3-Ligase, die das Substrat und das E2-Ubiquitin-Konjugat bindet, notwendig. Die meisten Koregulatoren zeigen eine E3 Ligase-Aktivität wie z. B. E6-AP (E6-associated protein), Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog), PIRH2, SNURF/RNF4 (RING finger protein 4), CHIP oder ARA54 (auch: RNF14) (Heemers & Tindall, 2007). USP10 (Ubiquitin Spezifische Protease 10) ist eine Deubiquitinase, die direkt mit dem AR interagiert. Sie ist ein Teil des DNA-gebundenen AR-Komplexes und stimuliert die AR-abhängige Transkription (Faus et al., 2005). SUMO-Proteine (small ubiquitin-

relativ modifiziert, auch Sentrin) modifizieren ähnlich wie Ubiquitin posttranskriptional verschiedene Proteine, die in die Regulation der Transkription und Chromatinstruktur involviert sind. Die Maschinerie, die für die Sumoylierung von Zielgenen verantwortlich ist, beinhaltet einen spezifischen aktivierenden Enzym-Komplex (SAE2 (SUMO-activating enzyme subunit 2)/SUMO-activating enzyme subunit 1), Konjugationsenzyme wie Ubc9 und E3-Ligasen wie z.B. PIAS (protein inhibitor of activated STAT), RanBP2 (RAN binding protein 2) und Pc2 (Proprotein convertase 2) (Geiss-Friedländer & Melchior, 2007). Die SENP1 (SUMO1/sentrin-specific protease) ist z. B. ein Mitglied der SUMO-spezifischen Proteasen und steigert die AR-vermittelte Transkription, indem es die HDAC 1 (Histon-Deacetylase 1) desumoyliert und so dessen Deacetylierungsaktivität reduziert (Cheng et al., 2004).

Kinasen und Phosphatasen wirken als Koregulatoren direkt auf den AR. PAK6 (p21-activated kinase 6) ist ein Mitglied der PAK-Familie von Serin-/Threonin-Kinasen und beinhaltet ein FxxMF-Motiv, mit dem es in der Lage ist, mit der LBD des ARs zu interagieren und als Aktivator zu wirken (van de Wijngaart et al., 2006; Trapman & Dubbink, 2007). Die Phosphatase SCP2 (small CTD (C-terminal domain) phosphatase 2), interagiert wie die meisten der Phosphatasen (Ward & Weigel, 2009) mit der NTD des ARs und schwächt dessen Transkriptionsaktivität. Es katalysiert die Dephosphorylierung zweier Phospho-Serine der RNA-Polymerase II CTD Heptapeptid-Wiederholungssequenz YSPTSPS. Der Phosphorylierungszustand der CTD spielt eine große Rolle bei der Transkriptionsregulation und der Bildung von mRNA (Thompson et al., 2006; Heemers & Tindall, 2007).

Koregulatoren des ARs können auch auf die basale Transkriptionsmaschinerie wirken. Die NTD des ARs interagiert z. B. mit RAP74 (Ras-related protein 74), einer großen Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIIF (Heemers & Tindall, 2007). Die Bindung an RAP74 induziert die Bildung einer α -helikalen Struktur in der AF1 und erleichtert eine Interaktion zwischen AR und dem p160-Koaktivator SRC-1. Darüber hinaus interagiert der AR selbst mit TFIIF und eine Überexpression der cdk-activating kinase subunit von TFIIF stimuliert die AR-vermittelte Transkription. Die Interaktion des ARs mit TFIIF erhöht die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA Polymerase II und ver-

bessert hierdurch die Effektivität der Elongation im Rahmen der Transkription von Zielzellen. Außerdem ist eine Interaktion zwischen dem AR und dem Elongationsfaktor p-TEFb beschrieben worden (Heemers & Tindall, 2007). Neben den Kontakten zu den allgemeinen Transkriptionsfaktoren interagiert der AR auch durch die Verbindung mit der Untereinheit RPB2 (RNA-Polymerase II subunit 2) direkt mit der RNA-Polymerase II. Eine Koexpression von RPB2, welches in die Elongation der Transkription involviert ist, stimuliert die AR-vermittelte Transkription von Zielgenen (van de Wijngaart et al., 2012).

Wichtige Koregulatoren des ARs sind auch Komponenten des NCoR-, SMRT- und Mediator-Komplexes. Die NCoR- oder SMRT-Multi-Protein-Komplexe binden in Abwesenheit des Liganden oder in Gegenwart eines antagonistischen Liganden mit Hilfe der NCoR- oder SMRT-Komponente an den Rezeptor. Ihre Funktion als AR-Korepressor wird u.a. durch die Rekrutierung von HDACs ausgeübt (van de Wijngaart et al., 2012). Der Mediator (MED)-Multi-Protein-Komplex, auch bekannt als TRAP/DRIP/ARC, wirkt als ein Brückenfaktor zwischen dem AR, den Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II. Die Rekrutierung von MED durch den AR beinhaltet eine direkte Interaktion zwischen der MED1-Untereinheit und der LBD des ARs über ein verlängertes LxxLL-Motiv (van de Wijngaart et al., 2012).

Auch einige zytoskelettale Proteine sind Koregulatoren des ARs. Aktin, ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts, wurde als Teil eines Chromatin-Remodeling-Komplexes gefunden und interagiert direkt mit RNA-Polymerasen (Miralles & Visa, 2006; Heemers & Tindall, 2007; Zheng et al., 2009). Gelsolin (GSN) ist ein Aktin-bindendes Protein, welches mit dem AR während der Translokation in den Kern über ein FxxFF-Motiv interagiert und die Liganden-abhängige AR-Aktivität erhöht (Archer et al., 2005; Nishimura et al., 2003). α -actinin-2 (mACTM2) ist ebenfalls ein zytoskelettales Protein, welches synergistisch mit SRC-2 (auch GRIP1) agiert und so die AR-Transaktivierungsaktivität erhöht. Es beinhaltet ein LxxLL-Motiv (Huang et al., 2004).

Unter den AR-Koregulatoren gibt es auch zahlreiche Proteine, die Bestandteile von Zell-Zell-Kontakten und Zelladhäsionskomplexen sind. Einige dieser Proteine wie LIN-11, ISL-1 und MEC-3 arbeiten als Gerüste oder Adapter für verschiedene

Signaltransduktionswege. Sie können mit fokalen Adhäsionen wie ARA55/Hic-5 (Hydrogen peroxide-inducible clone 5), Paxillin und FHL2 (Four-and-a-half-LIM-only protein 2) assoziieren (Heemers & Tindall, 2007). ARA55 bindet über 3 LIM-Domänen im C-Terminus (He et al., 2002) Liganden-abhängig an die LBD des ARs und erhöht so die Transkriptionsaktivität (Heemers & Tindall, 2007). Rack1 (Receptor for activated C kinase 1) interagiert mit der LBD des ARs. Es ermöglicht eine Liganden-unabhängige nukleäre AR-Translokation über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und unterdrückt sowohl Liganden-abhängige als auch Liganden-unabhängige AR-Transaktivierung durch PKC-Aktivierung. Außerdem kann RACK1 für eine Interaktion zwischen dem AR und der Src-Kinase sorgen, was zu einer verminderten Tyrosin-Phosphorylierung des ARs führt (Heemers & Tindall, 2007).

3.2 AR-Koregulatoren und ihre bekannte Rolle bei Erkrankungen

Über Mutationen oder veränderte Expression von Koregulatoren wurde bereits bei verschiedenen Erkrankungen berichtet. Die Arbeitsgruppe um Petrij zeigte, dass Punktmutationen im Gen, welches für CBP (CREB binding protein) kodiert, die Ursache für das Rubinstein-Taybi-Syndrom sein können. Dieses Syndrom ist durch mentale Retardierung und faziale Auffälligkeiten charakterisiert (Petrij et al., 1995; Lonard & O'Malley, 2012). Eine veränderte Struktur oder Expression von Koregulatoren wurde außerdem in vielen Tumorarten beschrieben. Eine komplette Inaktivierung der Kern-Komponente BAF47 (SNF5/INI1) des SWI/SNF-Komplexes ist z. B. ursächlich für aggressive Tumore des Kindesalters (Kahali et al.; 2014). In Mamma-Tumoren sind häufig SRC-1 und SRC-3 (auch AIB1) amplifiziert und/oder überexprimiert und deren Expression korreliert positiv mit einer schlechteren Prognose (Qin et al., 2009; Lahusen et al., 2009). In Prostata-Tumoren konnte SRC-2 als wichtiges Onkogen identifiziert werden und ist in ca. 8% der Primär-Tumoren und in ca. 37% der metastasierten Tumoren amplifiziert. SRC-2 fördert das Prostata-Tumor-Zellwachstum mittels einer Aktivierung der Cyclin D1-Expression. Außerdem kann SRC-2 auch AR-unabhängig seine Funktion ausüben und so das maligne Zellwachstum vorantreiben (Dasgupta et al., 2014 & 2015). Auch eine Überexpression von SRC-1 korreliert mit einer größeren Tumor-aggressivität. TIF2 (Transcription intermediary factor 2), ein Mitglied der p160-

Koaktivator-Familie, ist nah verwandt mit SRC-1 und erhöht in Zellkulturen bei Überexpression die AR-Aktivität (Agoulnik et al., 2006).

Auch bei PAIS-Patienten ohne ursächliche Mutation im AR-Gen gibt es bereits Hinweise darauf, dass eine veränderte Funktionalität oder Expression bestimmter Koregulatoren zu einem Defekt gewebespezifischer Androgen-abhängiger Prozesse führen können. Grundsätzlich können solche Koregulatoren sowohl im männlichen als auch im weiblichen Genitalhöcker exprimiert sein, aber dennoch nur im männlichen Genital unter Wirkung der Androgene ihren Effekt vermitteln. Es besteht die Möglichkeit, dass in einem kleinen Zeitfenster der Androgen-abhängigen Genitalentwicklung Koregulatoren exprimiert werden, die zusammen mit dem AR die geschlechtsdimorphe Entwicklung steuern und die zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar sind. Dass entsprechende AR-Koregulatoren zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht identifiziert werden konnten, könnte daran liegen, dass ein Großteil der bekannten AR-Koregulatoren in Prostata-Krebszellen identifiziert wurde. Entsprechend konnte in Microarray-Analysen von LnCap-Zellen und Genitalhautfibroblasten eine unterschiedliche Expression der bekannten AR-Koregulatoren festgestellt werden. Die Datenanalyse von 115 publizierten Microarrays aus 35 verschiedenen Geweben zeigte eine gewebespezifische Expression. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Identifikation von Koregulatoren, die bei der Geschlechtsentwicklung eine Rolle spielen, die Verwendung des richtigen Gewebes sehr wichtig ist (Bebermeier et al., 2006).

Adachi et al. konnten zeigen, dass Fibroblasten eines entsprechenden Patienten mit AIS-Phänotyp, normaler Androgen-Produktion und fehlender Mutation im AR-Gen nach der Transfektion mit einem AR-Expressionsvektor und einem Reporterkonstrukt eine verringerte Androgen-abhängige Transaktivierung aufwiesen (Adachi et al., 2000). Sie wiesen außerdem in Pull-Down-Experimenten mit einem AR-Konstrukt und Fibroblasten-Zellextrakt ein 90kd-Protein als Interaktionspartner des ARs in Normalkontrollen nach, das in Patientenzellen nicht mit dem AR zu interagieren schien. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass es sich hierbei um einen Koregulator des ARs handeln könnte, welcher im Patienten eingeschränkt exprimiert wird. Da eine Induktion der Expression von bekannten Koregulatoren wie p300, die mit der AF2 des ARs interagieren, keine

Änderung der Transaktivierung im Patienten zeigten, ging man davon aus, dass es sich um einen Koregulator handelt, der essentiell für die Weiterleitung des Aktivierungssignals von der AF1-Region des ARs zur Transkriptionsmaschinerie ist. Die entsprechende Protein-Bande konnte allerdings bis heute nicht genauer charakterisiert werden (Adachi et al., 2000).

Die Arbeitsgruppe von O'Malley beschrieb zwei Schwestern, die eine partielle Resistenz gegenüber Mineralokortikoiden, Glukokortikoiden und Sexualhormonen aufwiesen. Als Ursache wurde ein Defekt in einem gemeinsamen Koregulator der verschiedenen nukleären Rezeptoren vermutet (New et al., 2001). Des Weiteren führte die Arbeitsgruppe Knock-out-Experimente mit Mitgliedern der SRC-Familie an Mäusen durch. Männliche Mäuse, bei denen das SRC-1-Gen inaktiviert wurde, waren zwar lebensfähig und fertil, zeigten aber ein vermindertes Wachstum von Prostata und Hoden. SRC-1 scheint folglich in vivo die Steroidhormon-Antwort zu vermitteln und der Verlust seiner Kofaktor-Funktion resultiert in einer partiellen Androgenresistenz. Ein Knockout von SRC-2 führte bei beiden Geschlechtern zu Infertilität, bei den männlichen Mäusen zu testikulärer Degeneration, Teratozoospermie und einer Akkumulierung von intrazellulären Lipiden in Sertoli-Zellen. SRC-3-Knock-out-Mäuse zeigten zum Beispiel postnatal ein verringertes Wachstum und die Pubertät trat verspätet ein. Doppel-Knock-out-Mäuse waren nicht lebensfähig, was eine Kooperation der Mitglieder der SRC-Familie untereinander nahe legt (Xu et al., 1998; Ye et al., 2005; Dasgupta et al., 2014).

Im Mausmodell konnte außerdem gezeigt werden, dass ein Knock-out des AR-Koregulators und Cochaperons FKBP52 zur Hypospadie, Prostata-Dysgenese und beeinträchtigter Spermienbefruchtungskapazität führte. Andere AR-regulierte Organe wie Hoden und Nebenhoden waren nicht betroffen (Yong et al., 2006). Chen et al. zeigten, dass ein Mangel an FKBP52 in Maus-Fibroblasten eine verminderte AR-Aktivität an Genen, die die Geschlechtsentwicklung und das Zellwachstum kontrollieren, zur Folge hatte (Chen et al., 2010). Beleza-Meireles und Kollegen führten eine Studie mit 91 präpubertären Jungen mit isolierter Hypospadie durch, konnten hierbei jedoch keine Mutation im korrespondierenden FKBP4-Gen finden. Es konnte gezeigt werden, dass FKBP52 epithelial in der Epidermis der Penis-Haut exprimiert wird. Allerdings bestand kein Unterschied in der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Beleza-Meireles et al., 2007).

Zusammenfassend gibt es erste Hinweise auf Koregulatoren des ARs, die an der Maskulinisierung beteiligt sind und ursächlich für ein PAIS sein könnten, bei dem keine Mutation im AR-Gen detektiert werden konnte. Bislang konnte jedoch für keinen AR-Koregulator gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust in einem XY-Embryo die Ausbildung eines männlichen Genitals beeinträchtigt. Somit ist der Prozess der geschlechtsdimorphen Genitalentwicklung noch weitestgehend ungeklärt.

4. Zielsetzung und Fragestellungen

In dieser Arbeit sollte nach AR-Koregulatoren gesucht werden, die während der Androgen-abhängigen Entwicklung im Genital des männlichen Mausembryos exprimiert werden und möglicherweise eine für die Virilisierung des männlichen Genitales spezifische Rolle spielen. Hierzu sollten aus dem Genitalhöcker männlicher Mausembryonen die im Zeitfenster der Androgen-abhängigen Maskulinisierung (E15-17) exprimierten mRNAs extrahiert und in cDNA umgeschrieben werden. Mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Systems sollten diese cDNA-Bibliotheken verwendet werden, um putative AR-Koregulatoren zu isolieren, die Androgen-abhängig mit der Liganden-bindenden Domäne des ARs interagieren können. Durch die Identifizierung dieser Koregulatoren könnten neue Kandidatengene als Ursachen für Störungen der Genitalentwicklung im Menschen beschrieben werden. In Zukunft könnten durch genaue Analyse der Wirkungsweise dieser AR-Koregulatoren mögliche Therapieansätze bei PAIS oder beim Prostata-Karzinom gefunden werden.

Durch intrauterine Applikationsexperimente mit Flutamid, einem Antiandrogen, konnte als kritisches Zeitfenster für die Androgen-abhängige Maskulinisierung im Maus-Modell E15-E17 terminiert werden (Miyagawa et al., 2009). Mit Hilfe des Maus-Modells als Tier-Modell der embryonalen Entwicklung der äußeren männlichen Geschlechtsmerkmale sollten in dieser Arbeit AR-interagierende Proteine im Entwicklungsstadium E16 identifiziert werden. Positive Klone sollten zunächst durch Retransformation bestätigt und anschließend sequenziert werden. Über BLAST-Suche in den Nukleotid- und Protein-Datenbanken des NCBI sollten die Maus-Proteine identifiziert werden. Da im Screening die durch DHT aktivierte AF2 des ARs als Köder verwendet wurde, war zu erwarten, dass einige der positiven Klone konservierte AR-Bindungsmotive (FxxLF-, FxxFF-, FxxMF- und LxxLL-

Motive) enthielten, die mit der hydrophoben Bindungsgrube der AR-AF2 interagierten. Die Einstufung AR-bindender Proteine als potentielle Koregulatoren des ARs erfolgte dann aufgrund der vorhandenen Bindungsmotive, der bestehenden Kenntnisse über die Proteine und einer mehrfachen Isolierung im Screening. Die erneute Identifizierung bereits bekannter AR-Koregulatoren wurde erwartet und diente als interne Kontrolle des Screenings.

Die Bestätigung einer koregulatorischen Wirkung ausgewählter AR-interagierender Proteine sollte durch Kotransfektion in Reporterassays gezeigt werden. Koregulatoren sollten hierbei eine aktivierende oder reprimierende Wirkung auf die Androgen-abhängige Reporter-Transaktivierung haben. Lokalisation bzw. Kolo-kalisation der putativen Koregulatoren mit dem AR sollten anschließend mittels immunhistochemischer Färbung mit spezifischen Antikörpern an Paraffinschnitten des äußeren männlichen Genitale der Maus zum Zeitpunkt der Androgen-abhängigen Differenzierung überprüft werden.

II Materialien und Methoden

1. Materialien

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Apparaturen sowie ihrer zugehörigen Bezugsquellen mit Standorten befinden sich im Anhang. Von der Aufzählung ausgenommen sind Verbrauchsmaterialien, Geräte, Apparaturen und sonstige Hilfsmittel, die zur Standardausrüstung eines Labors gehören.

1.1 Mausembryonen

Für das Yeast-Two-Hybrid-Screening des Entwicklungsstadiums E16 und die immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils ein zeitlich gepaartes CD1 Mausweibchen von Charles River (Erkrath, Deutschland) für Gewebeentnahmen benötigt. Die Extraktion von Genitalhöckergewebe aus toten Mausembryonen wurde beim Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume unter der Versuchsnummer 32/A05/08 angezeigt und genehmigt.

1.2 Hefezellen

Für das Yeast-Two-Hybrid-Screening wurde der Hefestamm AH109 mit folgendem Genotyp verwendet:

MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 : : MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1

1.3 Säugerzellen

1.3.1 HeLa-Zellen

Bei HeLa-Zellen handelt es sich um menschliche Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom, die 1951 bei der afroamerikanischen Henrietta Lacks biopsiert wurden. Es ist die erste aneuploide permanent kultivierte menschliche Zelllinie. HeLa-Zellen haben eine Verdopplungszeit von 48 Stunden und exprimieren nicht endogen den AR. Die verwendeten HeLa-Zellen wurden bei der DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) erworben.

1.3.2 COS-1-Zellen

Für die Transaktivierungsassays kamen COS-1-Zellen zur Verwendung. Die Zellen stammen aus einer Zelllinie, die aus den immortalisierten CV-1-Zellen einer afrikanischen grünen Meerkatze (*Chlorocebus aethiops*) durch Transformation mit einem replikationsdefizienten Simian-Virus 40 hervorgegangen sind (Gluzman, 1981). Bei COS-1-Zellen handelt es sich um Fibroblasten der Niere. Sie wachsen adhärent mit einer Verdopplungszeit von 48 Stunden und exprimieren nicht endogen den AR. Die Zellen wurden von der DMSZ erworben.

1.4 Bakterienzellen

Die aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screening erhaltenen Plasmide wurden in *Escherichia coli* DH5 α -Zellen retransformiert (Protokoll siehe Methoden).

1.5 Plasmide

1.5.1 Yeast-Two-Hybrid-Plasmide für das Yeast-Two-Hybrid-Screening

Die Yeast-Two-Hybrid-Plasmide basieren auf den Vektoren des Matchmaker library construction and screening kit (Clontech, Mountain View, CA, USA). Mit Hilfe des pGBKT7-Vektors wurde ein Fragment des ARs als Fusion mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (BD) exprimiert. Die Expression der cDNA Bibliothek als Fusion mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) erfolgte mit dem pGADT7-Rec-Vektor.

1.5.2 Der AR Expressionsvektor pSVAR0

Die AR-cDNA im pSVAR0-Expressionsvektor wird über einen vorgeschalteten Promotor des Simianen Virus 40 (SV40) in Säugetierzellen stark exprimiert. Ein Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht die Selektion der mit dem Plasmid-transformierten *E. coli* für die Amplifikation des Plasmids. Der pSVAR0 Vektor wurde uns freundlicherweise von Dr. A. O. Brinkmann (Rotterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt, der diesen 1989 beschrieben hatte (Brinkmann et al., 1989). Eine Plasmidkarte findet sich im Anhang.

1.5.3 Der Reportervektor (ARE)₂-TATA-Luc

Die Promotorregion dieses Vektors besteht aus zwei androgen-responsiven Elementen (AREs) und einer TATA-Box. Über diesen Promotor wird das Gen der Leuchtkäfer-Luziferase Androgen-abhängig exprimiert (siehe Abbildung 5). Der (ARE)₂-TATA-Luc Vektor ist von Jenster et al. 1997 beschrieben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.



Abbildung 5: Promotor (ARE)₂-TATA

(ARE)₂-TATA-luc hat in seiner Promotorregion spezielle AREs, an die sich die DBD des ARs anlagert und so die Expression des Luziferasegens (Luc-Gen) initiiert.

1.5.4 Der Expressionsvektor phRG-TK

Der phRG-TK Vektor (Promega, Madison, WI, USA) kodiert für ein Luziferasegen (rluc, 1196bp) aus dem Nesseltier *Renilla reniformis*. Das Luziferasegen wird über einen Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK)-Promotor konstitutiv exprimiert. Diese Luziferase wird hormonunabhängig und unabhängig vom AR synthetisiert. So ermöglicht die Kotransfektion mit diesem Vektor eine Normalisierung nach der Transfektionseffizienz.

1.6 Puffer und Gele

1.6.1 Puffer für die Immunhistochemie

EZ-DeWax Solution, BioGenex: Die EZ-DeWax-Lösung gut schütteln, damit beide Phasen der Flüssigkeit sich vermischen. Zu 100 ml konzentrierter EZ-

DeWax Solution 90 ml 100% EtOH geben, so dass die Flüssigkeit klar wird. Gefäß gut verschließen und schütteln, damit die Komponenten sich gut vermischen. Falls die verdünnte Lösung sich in zwei Phasen aufteilt, nach und nach EtOH hinzugeben bis eine homogene Flüssigkeit entsteht. EZ-DeWax ist nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt.

Optimax-Waschpuffer, BioGenex: Der Optimax-Waschpuffer wurde bei 4°C aufbewahrt. Zunächst sollte der pH-Wert überprüft werden, da dieser bei 7,4 liegen sollte. 25 ml des konzentrierten Puffers wurden mit 475 ml autoklaviertem H₂O aufgefüllt und auf dem Rührer gemischt.

Antigen Retrieval Puffer: Der Antigen Retrieval Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt. In einem Glasgefäß wurden 1,21 g Tris Base (Endkonzentration 10 mM) und 0,37 g EDTA (Endkonzentration 1 mM) gegeben und bis zu einem Liter mit Wasser aufgefüllt. Nun wurde der pH-Wert geprüft, der hier bei 9 liegen sollte. Bei höheren Werten wurde vorsichtig 2 N HCl zugegeben und der pH 9 eingestellt. Mit abgeschnittener Pipettenspitze wurde dann 0,5 ml des 0,05%igen Tween 20 hinzugefügt. Der Antigen Retrieval Puffer wurde in ein Glas überführt und in ein Wasserbad bei 97°C gestellt.

10xTBS (konzentriertes TBS): 20 mM Tris und 140 mM NaCl werden in H₂O gelöst. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von HCl auf 7,6 eingestellt.

TBS: Pro Objektträger mit je 2 Gewebeproben wurden 50 ml für ein Falconröhrchen benötigt. In einem Falconröhrchen konnten jeweils 2 Objektträger (Rücken an Rücken) gewaschen werden. Da insgesamt 3 x mit TBS gewaschen wurde, wurden bei 2 Objektträgern also 150 ml des TBS benötigt. 100 ml TBS setzten sich dabei jeweils aus 10 ml des 10xTBS und aus 90 ml H₂O zusammen.

TBS + 0,025% Triton X-100: Da insgesamt 4 x mit TBS + 0,025% Triton X-100 gewaschen wurde, wurden bei zwei Objektträgern 200 ml benötigt. 100 ml der Lösung setzten sich jeweils aus 10 ml 10xTBS, 90 ml H₂O und 25 µl Triton X-100 zusammen.

TBS + 1% BSA (bovine serum albumine, fraction V, Sigma): Für 100 ml wurden 10 ml 10xTBS, 90 ml H₂O und 1 g BSA gemischt.

1.6.2 Agarose-Gel

Für die DNA-Elektrophorese wurden 1% Agarose-Gele auf TBE-Basis (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA+Na; pH 8,3) verwendet.

1.7 Medien

Agarplatten für die Anzucht von Bakterienkulturen

Für die Anzucht der Bakterienkulturen wurden Agarplatten mit Ampicillin oder Kanamycin benötigt. Für die Herstellung der Platten wurden 7,5 g Select Agar (Invitrogen, USA) und 13 Kapseln LB Medium (QBiogene, USA) mit 500 ml H₂O gemischt und bei 121°C autoklaviert. Bevor der Agar in Petrischalen überführt wurde, wurde er auf 60°C abgekühlt und entweder mit 150 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin versetzt. Nach erfolgter Abkühlung und Aushärtung wurden die Agarplatten bei 4°C gelagert.

LB (lysogeny broth)-Medium

Die Anzucht der Bakterien in Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium (10 g Tryptone, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl pro Liter). Für die Herstellung wurden 10 LB-Kapseln (QBiogene, USA) mit 400 ml destilliertem H₂O in einer Flasche bei 121°C autoklaviert und nach dem Abkühlen verwendet.

SOB (super optimal broth)-Medium

Für die Transformation von Bakterien wurde SOB-Medium verwendet. Pro Liter der Lösung wurden zu 950 ml destilliertem H₂O 20 g Select Peptone/Tryptone, 5 g Hefeextrakt und 0,5 g NaCl gegeben. Nach Auflösung durch Schütteln wurden 10 ml einer 250 mM KCl-Lösung hinzugegeben. Mittels 5 M NaOH wurde der pH auf 7,0 eingestellt und die Lösung bis zu einem Liter mit destilliertem H₂O aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Kurz vor dem Gebrauch wurden 5 ml einer autoklavierten 2 M MgCl₂ Lösung hinzugefügt.

SDC (synthetic dextrose complete)-Medium für Hefen

	SDC-Trp	SDC-Leu-Trp	SDC-4AS
Gesamtmenge	0,8 l	0,8 l	0,8 l
Yeast Nitrogen Base	5,4 g	5,4 g	5,4 g
Glucose	16 g	16 g	16 g
CSM-Ade-His-Leu-Trp-Ura	0,6 g	0,6 g	0,6 g
Ade (100x)	8 ml	8 ml	
Ura (100x)	8 ml	8 ml	8 ml
His (100x)	8 ml	8 ml	
Leu (100x)	8 ml		
Destilliertes Wasser	0,76 l	0,76 l	0,76 l

Die Lösung wurde mit 2 M NaOH auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt und bis zum endgültigen Volumen mit destilliertem H₂O aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Lösung für 20 Minuten bei 116°C autoklaviert.

Um entsprechende Platten herzustellen, wurde die Lösung in Portionen von 0,4 l in Flaschen aufgeteilt und vor dem Autoklavieren mit 8,8 g Agar und einem Rührfisch befüllt. Um Platten mit DHT gießen zu können, wurden 40 µl DHT pro 400 ml Flasche hinzugefügt (DHT-Lösung ist 1 mM, Platten müssen jeweils 100 nM DHT enthalten).

Stocklösungen für die Aminosäuren

ADE 100x (2 g/l): 0,5 g Adeninsulfat wurde in 248,5 ml H₂O und 2,5 ml 2 M NaOH-Lösung gelöst und autoklaviert.

His 100x (2 g/l): 0,5 g L-Histidin wurde in 250 ml H₂O gelöst und autoklaviert.

Leu 100x (5 g/l): 1,25 g L-Leucin wurde in 250 ml H₂O gelöst und autoklaviert.

Ura 100x (2 g/l): 0,5 g Uracil wurde in 250 ml H₂O gelöst und autoklaviert.

Alle Stocklösungen wurden bei RT gelagert.

YPDA-Lösung

Gesamtmenge	0,8 l
Yeast Extrakt	8 g
Peptone	16 g
Glukose	16 g
Ade (100x)	8 ml
Destilliertes Wasser	0,76 l

Die Lösung wurde mit HCl (Salzsäure) auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt und bis zum endgültigen Volumen mit destilliertem H₂O aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Lösung für 20 Minuten bei 116°C autoklaviert.

Um Platten herzustellen, wurde die Lösung in Portionen von 0,4 l in Flaschen aufgeteilt und vor dem Autoklavieren mit 8,8 g Agar und einem Rührfisch befüllt. Wenn der Agar abgekühlt war, konnte die Lösung in Petri-Schalen überführt werden.

Stocklösungen für die Lithium-Acetat-Transformation (LiOAc-Transformation)

Für die LiOAc-Transformation der aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screening gewonnenen Plasmide wurden verschiedene Lösungen benötigt.

10 x TE-Lösung	0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) + 10 mM EDTA (pH 8.0)
10 x LiOAc-Lösung	1 M LiOAc
50% PEG-Lösung	50 g PEG 3500 wird in 100 ml 1xTE gelöst

Li-TE-Lösung

Für 100 ml Li-TE-Lösung wurden 10 ml 10xTE-Lösung, 10 ml 10x LiOAc-Lösung und 80 ml H₂O gemischt. Die Zusammensetzung war daher 100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 1 mM EDTA.

2. Methoden

2.1 Herstellung elektrokompetenter DH5 α -Zellen

1600 ml LB-Medium wurden mit 16 ml (1/100) Übernacht-Kultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C und 220 rpm inkubiert und es erfolgte die regelmäßige Kontrolle der optischen Dichte (OD₆₀₀). Wenn eine OD₆₀₀ von 0,65-0,70 erreicht wurde, sich die Zellen also in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden die Erlenmeyerkolben mit den Zellen 15-30 Minuten auf Eis gestellt. Das Medium wurde in vorgekühlten Plastikflaschen bei 5.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgegossen, so dass am Boden der Plastikflaschen die Zellen als Pellet verblieben. Die Zellen wurden in 1.200 ml (4 x 300 ml) eiskaltem destilliertem H₂O resuspendiert und erneut bei 5.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das H₂O wurde abgegossen. Nun wurden die Zellen in 200 ml kaltem H₂O resuspendiert, auf vier vorgekühlte 50 ml Falconröhrchen verteilt und bei 4.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 32 ml (4 x 8 ml) eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert und erneut bei 4.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Es erfolgte eine erneute Resuspension in 4,5 ml (4 x 1,125 ml) eiskaltem 10% Glycerol. Hiervon wurden jeweils 60 bzw. 240 μ l Aliquots in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße auf Eis pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im -70°C-Tiefkühlschrank aufbewahrt.

2.2 Herstellung der cDNA und das Yeast-Two-Hybrid-System

Das Yeast-Two-Hybrid-System in *Saccharomyces cerevisiae* wurde in den späten 80er Jahren von der Arbeitsgruppe um Stanley Fields entwickelt, um Untersuchungen von Protein-Wechselwirkungen *in vivo* zu ermöglichen. Es basiert auf dem Gal4-Protein, einem Transkriptionsfaktor, der sich aus einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) zusammensetzt (Fields & Song, 1989). In den Hefen werden zwei Fusionsproteine exprimiert. Protein X fusioniert zur Gal4-DBD und stellt so den Köder (Bait) dar. Protein Y fusioniert zur Gal4-AD und stellt so die Beute (Prey) dar. Wenn Protein X und Y interagieren, kommen die DBD und AD von Gal4 in räumliche Nähe, die DBD bindet an die Gal4-UAS (upstream activating sequence) oberhalb eines Reportergens und die Transkription wird aktiviert. Die Transkription des Reporters ist

hierbei abhängig von der Interaktion der Proteine X und Y. Der Reporter kodiert ein Enzym, welches für die Synthese einer bestimmten Aminosäure/Nukleinbase notwendig ist, so dass durch die Aktivierung des Reporters ein Wachstum auf Medium ohne diese Aminosäure/Nukleinbase ermöglicht wird.

Um Koregulatoren zu finden, die während der Embryonalentwicklung des äußeren männlichen Genitales mit dem AR interagieren, haben wir cDNA-Bibliotheken aus dem Genitalhöcker (genital tubercle, GT) von männlichen Mausembryonen hergestellt und mit einem Yeast-Two-Hybrid-System auf Interaktionspartner des ARs untersucht. Hierfür wurde das Matchmaker library construction and screening kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) verwendet.

Das Matchmaker-System beinhaltet neben den Plasmiden und Hefen für das eigentliche Screening in den Hefen auch Enzyme, um aus einer RNA-Präparation cDNAs durch reverse Transkription herzustellen. Dabei werden an die beiden Enden der cDNAs bestimmte kurze DNA-Sequenzen, sogenannte Linker-Sequenzen, angebaut, die den Einbau der cDNAs in das linearisierte Prey-Plasmid erlauben.

Die verwendete SMART-(Switching Mechanism at 5' End of RNA Template) Technik für die Fusion mit den Linkern bietet den Vorteil, dass cDNAs, die nicht vollständig revers transkribiert wurden, nicht amplifiziert werden können. Bei der SMART-Methode werden die mRNAs zunächst über einen oligo-(dT)-Primer revers transkribiert. Die verwendete Reverse Transkriptase besitzt auch die Aktivität einer terminalen Transferase und baut daher wenige Nucleotide mehr (meist Desoxycytidine) an das 3'-Ende der synthetisierten cDNA, wenn sie bis an das 5'-Ende der RNA durchsynthetisiert. Ein spezieller SMART-Primer mit oligo-(dG)-Abschnitt kann sich daher anlagern und den Strang-Wechsel der Reversen Transkriptase ermöglichen. Die cDNA wird dadurch in 3'-Richtung verlängert. Im nächsten Schritt werden die einzelsträngigen cDNAs durch PCR amplifiziert. Da der hierbei verwendete 5'-Primer sich an den nach dem Strangwechsel synthetisierten Bereich anlagert, werden nur cDNAs amplifiziert, die aus vollständigen Synthesen (bis zum 5'-Ende der RNAs) hervorgegangen sind. Der oligo-(dT)-Primer und der Smart-Primer beinhalten auch Linker-Sequenzen und bewirken daher eine Fusion der cDNAs mit den Linkern. Die durch die SMART-

Technik an die cDNAs gebauten Linker-Sequenzen sind homolog zu den Enden des linearisierten Prey-Plasmids. Daher können die cDNAs durch homologe Rekombination in der Hefe in das Plasmid eingebaut werden. Für das Screening werden Hefen verwendet, die bereits das Bait-Plasmid tragen. Diese werden dann mit dem linearisierten Prey-Plasmid und den cDNAs transformiert. Man erhält eine Kollektion von Hefezellen mit demselben Bait-Plasmid und unterschiedlichen Prey-Plasmiden (siehe Abbildung 6).

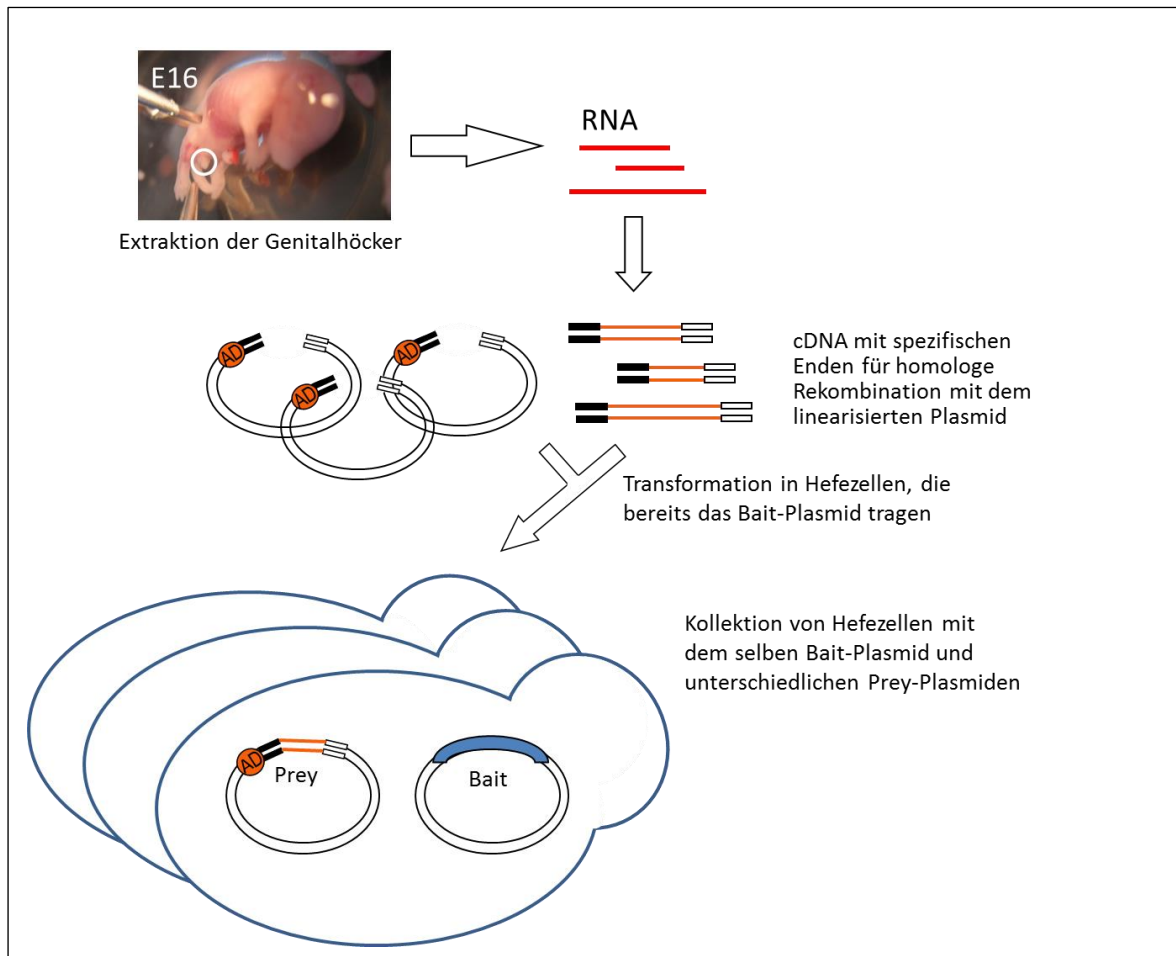


Abbildung 6: Das Matchmaker-System in *S. cerevisiae*

Nach Extraktion der Maus-Genitalhöcker des Entwicklungsstadiums E16 werden mit Hilfe von Enzymen, die im Matchmaker-System enthalten sind, aus der RNA durch reverse Transkription cDNAs hergestellt. An beiden Enden der cDNA werden kurze DNA-Sequenzen, sogenannte Linker, angebaut. Diese Linker-Sequenzen erlauben den Einbau der cDNAs in das linearisierte Prey-Plasmid und sind homolog zu den Enden des linearisierten Plasmids. So ist es möglich, dass die cDNAs durch homologe Rekombination in der Hefe in das Plasmid eingebaut werden können. Für das Screening werden Hefen verwendet, die bereits das Bait-Plasmid tragen. Diese werden dann mit dem linearisierten Prey-Plasmid und den cDNAs transformiert. Man erhält eine Kollektion von Hefezellen mit demselben Bait-Plasmid und unterschiedlichen Prey-Plasmiden.

2.2.1 Herstellung der cDNA-Bibliothek

Zunächst wurden von Mausembryonen des Entwicklungsstadiums E16 die GTs extrahiert, da in diesem Stadium erste Androgen-abhängige Veränderungen im GT von männlichen Mausembryonen auftreten. Die extrahierten GTs wurden in PBS gewaschen und separat in RNAlater (Invitrogen/Thermo Scientific, Karlsruhe) bis zur RNA-Extraktion aufbewahrt, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Gleichzeitig wurde von jedem Embryo auch eine Gewebeprobe der Schwanzspitze für die Geschlechterbestimmung genommen, da nur mit den männlichen Mausembryonen weitergearbeitet wurde. Die DNA aus Gewebe des Schwanzes wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert und das Geschlecht der Embryonen mittels Y-spezifischer PCR unter Benutzung der Primer Zfy1_s und Zfy1_a (Wang et al., 2001) bestimmt.

Mix für Y-spezifische PCR	
HF Puffer	200 µl
dNTPs (2,5 mM)	100 µl
Primer Zfy1_s (GACTAGACATGTCTTAACATCTGTCC)	20 µl
Primer Zfy1_a (CCTATTGCATGGACAGCAG CTTATG)	20 µl
H ₂ O	590 µl
Phusion Taq	10 µl
47 µl der Mischung mit jeweils 3 µl der DNA-Präparation mischen	

Die männlichen GTs wurden vereinigt und die RNA mit Hilfe des RNA plus Mini Kits (Qiagen, Hilden, Germany) extrahiert. Die Qualität und Quantität der RNA wurde unter zu Hilfenahme des Agilent RNA 6000 Kits und einem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) kontrolliert. Für die cDNA-Synthese wurden 0,8-1,4 µg der RNA von männlichen GTs eingesetzt. Wie unter 2.2. genauer beschrieben, wurde unter Verwendung der SMART (Switching Mechanism at 5'end of RNA Template)-Technik die cDNA mit spezifischen Enden für den Einbau durch Rekombination in pGADT/-Rec hergestellt.

Das C-terminale Fragment des ARs, welches die Aminosäuren 555-920 und somit die DBD, die Hinge Region und die LBD beinhaltet, wurde im Expressionsplasmid pGBKT7-Rec mit der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 fusioniert. Das so entstandene Bait-Plasmid pGBK_AR555 wurde in den Hefe-Stamm AH109 transformiert. Anschließend wurde der Hefestamm AH109, der pGBK_AR555 bereits beinhaltet, mit der cDNA-Bibliothek aus dem GT des Entwicklungsstadiums E16 und dem geschnittenen Plasmid pGADT7-Rec transformiert. Hierdurch wurden mittels homologer Rekombination in den Hefezellen die cDNAs in das Plasmid pGADT7-Rec eingebaut und die cDNAs mit der AD von GAL4 fusioniert. Es entstand eine Kollektion von Hefezellen, die jeweils ein AR-Bait-Konstrukt und ein Prey-Fusionsprotein aus einer cDNA und der Aktivierungsdomäne von Gal4 exprimierten.

Im Genom des Hefestammes mit dem Genotyp AH109 sind Reportergene integriert, die im Promotorbereich spezifische Sequenzen aufweisen. Diese Sequenzen wurden durch die DBD von Gal4 erkannt. Kam es zu einer Interaktion von dem Fusionsprotein aus Gal4-Bindungsdomäne und AR (Bait) mit einem Fusionsprotein aus GT-cDNA und Gal4-AD (Prey), wurde in den Hefen die Transkription der Reportergene induziert. Die Reportergene kodieren für Enzyme, die für die Synthese bestimmter Aminosäuren und Nukleinbasen notwendig sind. In diesem Fall handelte es sich um Histidin und Adenin. Positive Klone wurden deshalb nur auf Medien ohne Histidin und Adenin selektiert. Auch Leuzin und Tryptophan fehlten im Selektionsmedium, da die Anwesenheit des Baits und eines Prey-Plasmids die Synthese dieser beiden AS ermöglichte. Außerdem wurden die Screenings auf Medien mit 100 nM DHT durchgeführt, da viele Koregulatoren nur nach einer Androgen-abhängigen Konformationsänderung des ARs mit dem AR einen Komplex bilden können (siehe Abbildung 7). Die Kolonien wurden nach 3-5 Tagen Inkubation bei 30°C isoliert.

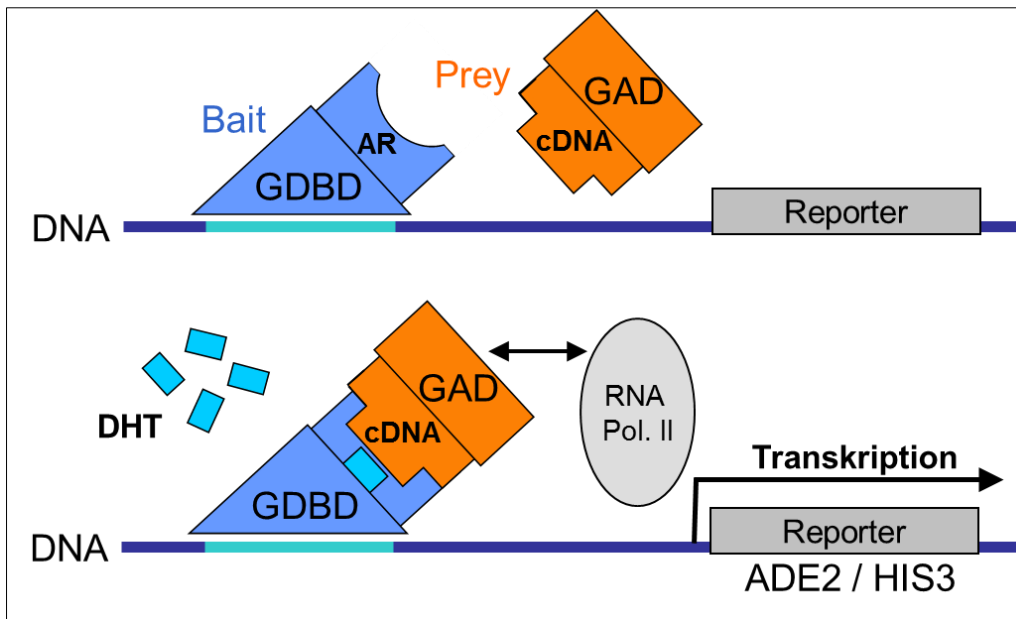


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Yeast-Two-Hybrid-Systems

Bait: Fragment des ARs fusioniert mit der DNA-BD von Gal4 (GDBD)

Prey: cDNA aus dem GT männlicher Mausembrionen fusioniert mit der AD von Gal4 (GAD)

2.2.2 Yeast-Two-Hybrid-Screening-Protokoll

Der verwendete Hefestamm AH 109 teilte sich alle 2 Stunden in SDC-Trp-Medium bei 30°C. Um am Morgen eine Kultur mit der benötigten optischen Dichte (OD_{600}) von 0.2 bis 0.3 zu erhalten, wurde am Abend zuvor (15 Stunden zuvor) die OD_{600} einer dicht gewachsenen Flüssigkultur gemessen und in 50 ml SDC-Trp entsprechend verdünnt (z.B.: Verdünnungsfaktor bei einer OD_{600} am Abend von 1,0=1,0 geteilt durch 0,3 geteilt durch $2^{15:2}$) und bei 30°C und 230 rpm über Nacht im Schüttler inkubiert.

Am Morgen des Screenings wurden die 50 ml Zellen bei einer OD_{600} von 0.2 bis 0.3 in ein 50 ml-Falkonröhrchen überführt und bei 700 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 ml frischem SDC-Trp-Medium resuspendiert und erneut bei 30°C im Schüttler inkubiert. Die OD wurde regelmäßig überprüft. Bei einer OD von 0.5 wurden die Zellen wie zuvor abzentrifugiert und dann in 50 ml H₂O zum Waschen resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in 3 ml 1.1xTE/LiAc resuspendiert und in zwei 1,5 ml-Eppendorfröhrchen gegeben. Bei 15.000 g wurden die Zellen für 15 Sekunden erneut pelletiert und anschließend pro Röhrchen in 600 µl 1.1xTE/LiAc resuspendiert.

In 50 ml-Falkonröhrchen wurden jeweils 10 µl der zuvor hergestellten cDNA, 6 µl pGAD-Rec (SmaI geschnitten, aus dem Kit) und 24 µl Herring testes carrier DNA (aus dem Kit, wurde zuvor 2 x für 5 Minuten bei 98°C denaturiert) vermischt. Dann wurden jeweils 600 µl Hefezellen hinzugegeben und durch vorsichtiges Pipettieren mit der DNA-Mischung vermengt. Nach der Zugabe von 2,5 ml PEG/LiAc wurde die Zellsuspension vorsichtig mit dem Vortexer vermischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation im 30°C-Wasserbad für 45 Minuten. Dabei wurden die Zellen vorsichtig alle 15 Minuten kurz mit dem Vortexer geschüttelt, um ein Absetzen der Zellen zu verhindern. 160 µl DMSO wurden zu den Zellen gegeben und mit dem Vortexer untergemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 42°C im Wasserbad für 20 Minuten. Hierbei wurden die Zellen alle 10 Minuten gemischt. Für 5 Minuten wurden die Zellen bei 700 g erneut abzentrifugiert und anschließend in 3 ml YPD Plus-Medium (aus dem Kit) resuspendiert. Die Falconröhrchen mit den Zellen wurden dann für 90 Minuten bei 30°C und 200 rpm im Inkubator geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen wie zuvor abzentrifugiert und in 6 ml einer 0.9% NaCl-Lösung resuspendiert.

Für das eigentliche Screening wurden jeweils 150 µl Zellsuspension auf 20 Platten und jeweils 100 µl Zellsuspension auf 30 Platten SDC -4 AS + DHT mit Glas-kügelchen ausplattiert und bei 28°C für 6 Tage inkubiert.

Um die Ko-Transformationseffizienz zu bestimmen, wurden 30 µl der Zellen mit 720 µl 0.9% NaCl-Lösung weiter verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 100 µl auf 3 Leu-Trp-Platten gegeben, so dass auf diesen Platten alle Ko-transformierten Zellen wachsen konnten.

2.3 Analyse der isolierten Hefeklone

2.3.1 Extraktion der Plasmid-DNA aus den Hefekolonien

Mit den isolierten Kolonien aus dem Screening wurden jeweils 2 ml SDC-Leu angeimpft und bei 30°C bis zur Sättigung im Schüttler angezogen. Die Plasmid-DNA wurde nach Protokoll mit dem Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep I (Zymo Research, USA; Catalog No. D2001; Lot No ZRC 161184) extrahiert.

Eine Solution 1-Zymolyase-Mischung wurde angesetzt. Pro ml Solution 1 wurden 13 µl Zymolyase hinzugefügt. Pro Eppendorfgefäß werden 150 µl der Mischung benötigt.

Die Hefekulturen wurden 2 Minuten bei 600 x g abzentrifugiert, die Pellets in 150 µl Solution 1-Zymolyase-Mischung resuspendiert, jeweils in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden jeweils 150 µl der Solution 2 hinzugegeben und gut gemischt. Nach Zugabe von 150 µl Solution 3 wurden die Ansätze erneut gut durchmischt und 2 Minuten bei 20.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand von ca. 400 µl wurde in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und es wurden jeweils 400 µl Isopropanol (2-Propanol) zur Fällung der DNA hinzugegeben. Die Proben wurden gut gemischt. Nach 8 Minuten Zentrifugation bei 20.000 x g wurden die Überstände abgenommen und verworfen. Die Proben wurden erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die DNA-Pellets wurden 10 Minuten luftgetrocknet und dann in jeweils 35 µl autoklaviertem Wasser resuspendiert.

2.3.2 Identifizierung der Klone

2.3.2.1 Amplifikation der Inserts aus den Hefepiasmiden durch PCR

Es wurde pro Klon ein Master-Mix für die PCR-Reaktion hergestellt.

Ex Taq DNA Polymerase Hot Start (Clontech/TaKaRa, Code No. RR006A)	0,125 µl
Ex Taq Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (jeweils 2.5 mM)	2 µl
Primer MM5' (MM-5pAD LD)***	0,5 µl
0,5 µl Primer MM3' (MM-3pAD LD)	0,5 µl
H ₂ O (autoklaviert)	18,875 µl
→ je 24,5 µl + 0,5 µl der jeweiligen Plasmid-Präparation in 0,5 ml Eppendorf mischen	

Der PCR-Mix wurde anschließend in den Mastercycler gegeben.

Mastercycler-Programm, Deckeltemperatur 104 °C		
1)	98°C	10 Sek
2)	98°C	10 Sek
3)	68°C	2 Min
4)	2 & 3	30 x
5)	2 & 3	3 Min
6)	8°C	Hold

Die PCRs wurden auf einem 1% Agarose-Gel analysiert. Hierfür wurden 1,5 µl 6-fach Ladepuffer (30% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau) mit 7,5 µl des PCR-Ansatzes gemischt. Zusätzlich zu den Proben wurden 6 µl DNA 1kB-Marker geladen. Die Proben wurden 45 Minuten bei 10 V/cm getrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt (siehe Abbildung 8).

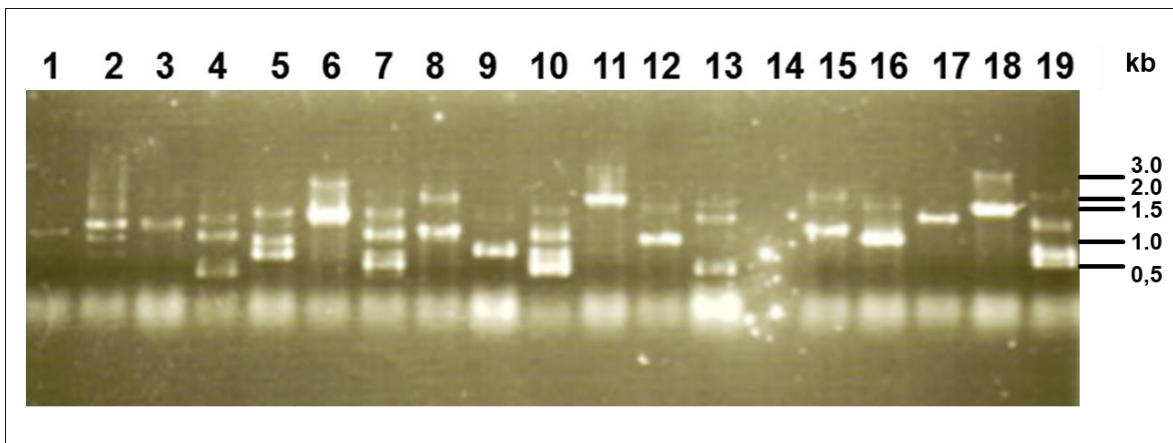


Abbildung 8: Amplifikation der Inserts aus den Hefepiasmiden durch PCR.

Es zeigen sich Proben mit einer starken Bande wie z. B. Probe 11 oder 17 und Proben, die mehrere Banden erzeugt haben wie z. B. Probe 5 oder 7.

2.3.2.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

Proben mit einer einzigen starken Bande in der PCR konnten direkt sequenziert werden. Sie wurden mit Exonuklease I und SAP (Shrimp Alkalische Phosphatase) vorbehandelt. SAP entfernt die Phosphatgruppen von den überschüssigen dNTPs und Exonuklease I verdaut die Einzelstrang-PCR-Primer, die von der PCR übrig geblieben waren. Hierfür wurden 5 µl des PCR-Ansatzes mit 1 µl SAP und 0,5 µl

Exonuklease I gemischt und in den Mastercycler gegeben (Programm siehe Tabelle). Die Enzyme müssen anschließend hitzeinaktiviert werden.

Mastercycler-Programm		
1)	Hold 37°C	> Enter drücken
2)	37°C	15 Min
3)	85°C	15 Min
4)	4°C	Hold

Im Anschluss wurden die Sequenzieransätze à 20 µl pro Klon wie folgt gemischt:

Primer MM-5pAD LD (10 pmol/µl)	1 µl
Big Dye	2 µl
5fach Puffer	3 µl
H ₂ O (autoklaviert)	7,5 µl
→ je 13,5 µl zu 6,5 µl des PCR-SAP-Exonuklease I-Mixes geben	

Die Ansätze wurden in den Mastercycler gegeben (Programm siehe Tabelle).

Mastercycler-Programm, Deckeltemperatur 105 °C		
1)	Hold 96°C	> Enter drücken
2)	96°C	3 Min
3)	50°C	20 Sek
4)	60°C	4 Min
5)	96°C	20 Sek
6)	3, 4 & 5	24 x
7)	50°C	20 Sek
8)	60°C	4 Min
9)	4°C	Hold

BigDye (Applied Biosystems) für die Kettenabbruchmethode nach Sanger beinhaltet dNTPs, Polymerase und Fluoreszenz-markierte ddNTPs für den Abbruch und die Markierung der synthetisierten DNA-Stränge.

Bei der Sanger Sequenzierung mit BigDye wird jedes der vier ddNTPs mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. Diese Modifikation erlaubt es, alle vier ddNTPs in einem Reagenzgefäß zuzugeben. So entfallen eine Aufspaltung in getrennte Ansätze und der Umgang mit Radioisotopen. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen dadurch Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und können so von einem Detektor erkannt werden. Das Elektropherogramm, also die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen, gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

2.3.2.3. Aufreinigung der Sequenzieransätze

Die Abtrennung überschüssiger BigDye-Terminatoren erfolgte durch Gelfiltration mit Nucleo SEQ Columns (Machery-Nagel, Düren, Deutschland). Zunächst wurde das trockene Pulver in den Röhrchen für 30 Sekunden bei 750 x g zentrifugiert. Es wurden 600 µl autoklaviertes H₂O hinzugefügt, per Vortexer gemischt und für 30 Minuten inkubiert. Die Deckel wurden entfernt und der Ansatz wurde bei 750 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Das abzentrifugierte H₂O sowie die unteren Röhrchen wurden verworfen und die oberen Röhrchen in neue Eppendorf-Behältnisse gestellt. Nun wurden je 20 µl Sequenzieransatz in die Mitte des Röhrchens gegeben und für 5 Minuten bei 750 x g zentrifugiert. Das obere Röhrchen wurde verworfen und die Eppendorfbehältnisse wurden geschlossen.

2.3.2.4 Analyse der Sequenz

Mit Hilfe des 4-Kapillarsequenzierers 3130-Genetic-Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi) erfolgte die Analyse der gewonnenen DNA. Der Sequenzierer trennte die unterschiedlich langen DNA-Stränge elektrophoretisch auf und mit Hilfe eines Lasers wurde der Fluoreszenzfarbstoff detektiert. Nun konnte die Übersetzung der Informationen in ein Chromatogramm erfolgen. Jede Base war hier mit einer anderen Farbe dargestellt, wobei die Höhe der Peaks mit der Signalstärke korrelierte (siehe Abbildung 9).

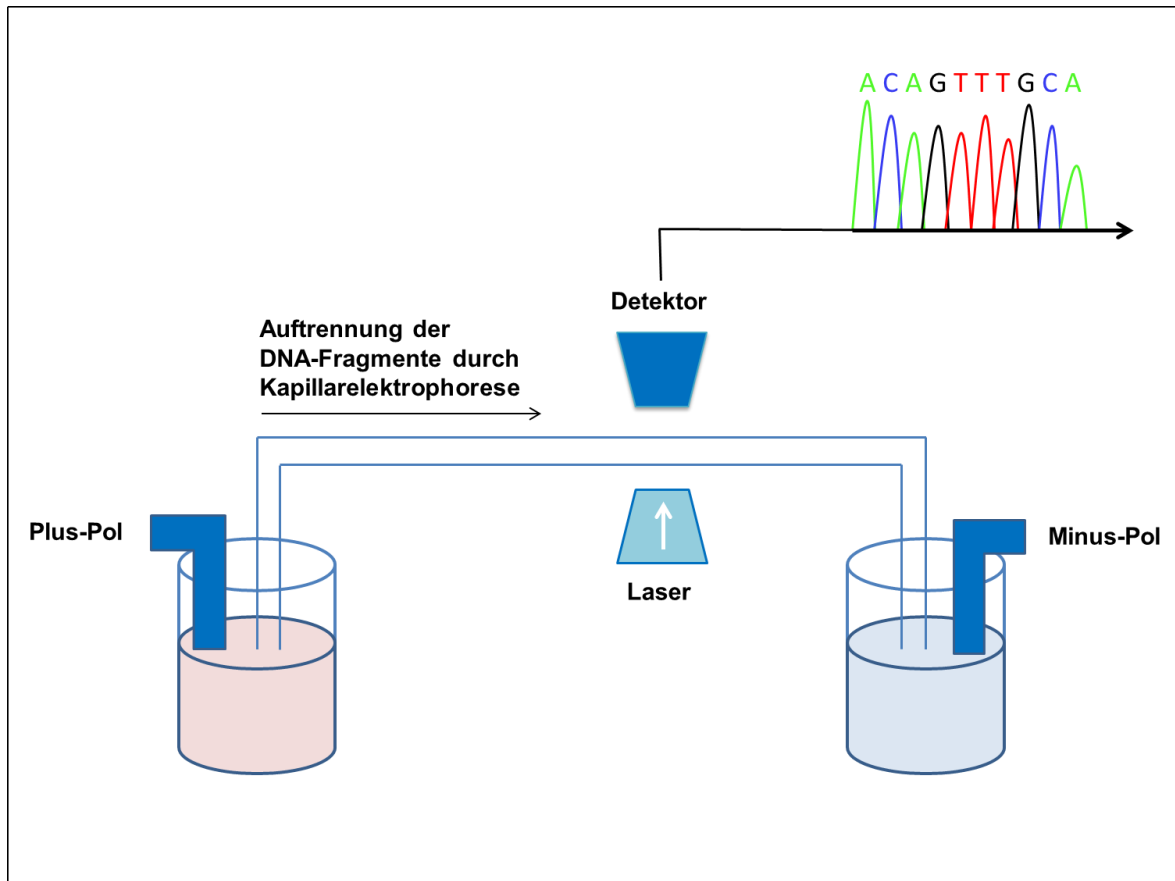


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Basen-Detektion im Kapillarsequenzierer

Die DNA-Fragmente aus der Sequenzierungsreaktion wurden in der Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Laser detektiert. Jedes Fragment schloss mit einem ddNTP ab, welches den Kettenabbruch bewirkte. Die ddNTPs waren je nach Base mit vier verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert, so dass die Information in eine Basensequenz übersetzt werden konnte. Im Chromatogramm (rechts oben) ließen sich die verschiedenen Basen zuordnen, die Höhe der Peaks korrelierte hierbei mit der Signalstärke.

Im Anschluss wurde mit der Software Sequence-Analysis 5.2 (ABI, USA), SeqManager Lasergene 6.0 (DNASTar, USA), BlastN und den Tools der Saccharomyces Genome Database (SGD) die Sequenz ausgewertet.

Auf der Homepage der SGD (www.yeastgenome.org) wurde zunächst überprüft, ob die Sequenz im Leseraster lag. Hierfür wurde die Sequenz translatiert. Da die Eco-Schnittstelle im Leseraster mit dem ORF (open reading frame) der Aktivierungsdomäne von pGAD lag, wurde die entsprechende Sequenz (GAATTC) als Startsequenz für die Translation verwendet. Unter dem Punkt Gen/Sequence Resources wurde die Sequenz in das entsprechende Feld kopiert und es wurde auf den Button „submit form“ geklickt. So wurde die translatierte Protein-Sequenz

generiert. Ein * stand für ein Stop-Codon. Lag die Sequenz im Leseraster, wurde auf der Homepage des National Center of Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) die Sequenz in das entsprechende Feld kopiert und die Maus-RefRNA-Datenbank durchsucht. Man erhielt eine NM-Nummer und eine Gene-ID zum entsprechenden Protein. Die NM-Nummer wurde kopiert und in das Programm SeqBuilder Lasergene (DNASar, USA) eingefügt und die Sequenz heruntergeladen und gespeichert.

2.3.2.5 Bakterientransformation und Präparation von reiner Plasmid-DNA

Da durch die Minipräparationen aus den Hefezellen nur verunreinigte Plasmid-DNA in geringer Konzentration und in einigen Fällen Mischklone (Hefezellen mit 2 Prey-Plasmiden) gewonnen werden konnten, war von den meisten Plasmiden eine direkte Sequenzierung des Inserts nicht möglich. Daher wurde die DNA in *E. coli*-DH5 α -Zellen transformiert. Hierfür wurden 50 μ l elektrokompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 3 μ l Plasmid-Präparation gemischt. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spalt = 0,2 cm) gegeben und einem 2500 Volt-Elektroimpuls ausgesetzt. Möglichst schnell nach dem Impuls wurden 500 μ l auf 37°C vorgewärmtes SOB-Medium hinzugefügt. Der Ansatz wurde in der Küvette 45 Minuten bei 37°C inkubiert und im Anschluss auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mit vier einzelnen Kolonien (jeweils a, b, c, d) jedes Klons wurden 3 ml LB-Amp-Flüssigkulturen angeimpft und über Nacht bei 37°C angezogen. Die DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß der Anleitung extrahiert.

2.3.2.6 Restriktionsverdau der Plasmide zur Identifikation von Mischklonen

Zur allgemeinen Qualitätskontrolle der Plasmid-Präparationen und zur Identifikation von Mischklonen wurden alle Plasmide mit den Restriktionsenzymen *Pst* I und *Hind* III verdaut.

Ansatz à 10 µl		
<i>Pst</i> I	0,2 µl	
<i>Hind</i> III	0,2 µl	
BSA (10x)	1 µl	
Puffer 2 (10x)	1 µl	
H ₂ O (autoklaviert)	6,1 µl	alternativ: 4,6 µl
Minipräparation	1,5 µl	alternativ: 3 µl

Die Mischung wurde kurz abzentrifugiert und bei 37°C ca. 1 Stunde inkubiert. Zum Restriktionsverdau wurden jeweils 2 µl Ladepuffer (6 x) gegeben. Die 1. Kammer des Gels wurde mit 6 µl 1kB-Marker geladen. Die Ansätze wurden 45 Minuten bei 10 V/cm getrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Im Anschluss erfolgte die Auswahl der Klone, wobei nur unterschiedliche Klone ausgewählt wurden (siehe Abbildung 10).

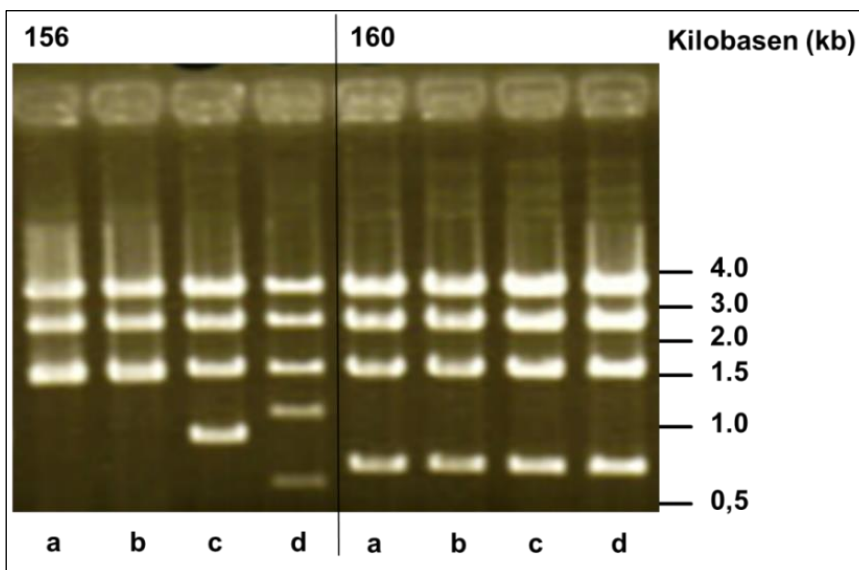


Abbildung 10: Restriktionsverdau der Plasmide zur Identifikation von Mischklonen

Hier ist exemplarisch der Restriktionsverdau der Klone 156 a, b, c, d und 160 a, b, c, d gezeigt. Gepickt wurden nur unterschiedliche Klone, hier die Klone 156 a, c und d und der Klone 160 a.

2.3.2.7 Sequenzierung der Plasmide

Nach dem Restriktionsverdau konnte die Sequenzierung der ausgewählten Klone erfolgen.

Sequenzieransätze à 20 µl	
Primer MM-5pAD LD (10 pmol/µl)	1 µl
Big Dye	1 µl
5fach Puffer	3,5 µl
H ₂ O (autoklaviert)	11,5 µl
Minipräparation	3 µl

Die Ansätze wurden wie zuvor beschrieben (siehe 2.3.2.2) im Mastercycler amplifiziert. Auch alle weiteren Schritte wurden wie in 2.3.2.3 und 2.3.2.4 beschrieben durchgeführt.

2.4 LiOAc-Transformation der Hefen

Um auszuschließen, dass es während des Yeast-Two-Hybrid-Screenings zu Veränderungen der Hefen gekommen war, die das Wachstum der Zellen auf selektivem Medium erlaubten, wurden die 200 isolierten Klone/Plasmide mit Hilfe der LiOAc-Transformation in den Hefestamm AH109 zusammen mit pGBK_AR555 retransformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden auf Medium ohne Adenin, Histidin, Leuzin und Tryptophan selektiert und nach 4 Tagen Inkubation bei 30°C fotografiert.

Für die LiOAc-Transformation der Hefen wurde eine 50 ml Zellkultur bei 30°C bis etwa OD₆₀₀= 0.5 bebrütet. Die Zellen wurden bei 2000 rpm für 5 Minuten pelletiert und im Anschluss mit 15 ml Li-TE gewaschen und erneut pelletiert. Zu den Zellen wurde 500 µl Li-TE hinzugefügt und bei RT stehen gelassen. 3 µl der Herring Testes Carrier DNA wurde mit 5 µl Plasmid-DNA in einem Eppendorfgefäß gemischt. Es wurden 50 µl der Zellen in Li-TE hinzugefügt und gemischt. Nun wurden 150 µl 50% PEG hinzugegeben und mit 5 kurzen Impulsen auf dem Vortexer gemischt. Die Mischung wurde zunächst 30 Minuten bei RT, dann 15 Minuten bei 42°C inkubiert und im Anschluss 10 Minuten bei RT abgekühlt. Nun wurde die Mischung mit 200 µl TE gemischt und jeweils 200 µl auf Agar-Platten mit selektivem Medium (SDC ohne Adenin, Histidin, Leuzin und Tryptophan) gegeben. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.5 Retransformation interessanter Klone in Hefe

Für die als interessant eingestuft Proteine wurde untersucht, ob die entsprechenden Prey-Plasmide (Fusionsprotein aus cDNA und Aktivierungsdomäne von Gal4) auch nach einer erneuten LiOAc-Transformation in die Hefen in Kombination mit dem AR-Bait das Wachstum der Hefen induzieren konnten. Außerdem war wichtig, ob das induzierte Wachstum erneut Androgen-abhängig erfolgte. Es sollte ausgeschlossen werden, dass es während des Yeast-Two-Hybrid-Screenings zu Veränderungen der Hefen gekommen war, die das Wachstum der Zellen auf selektivem Medium erlaubten. Hierfür wurden die isolierten Plasmide mit Hilfe der LiOAc-Transformation in den Hefestamm AH109 zusammen mit pGBK_AR555, pGBK_AR618, pGBK_AR645 und einem leeren Vektor als Negativ-Kontrolle retransformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden wie zuvor auf Medium mit 100 nM DHT ohne Adenin, Histidin, Leuzin und Tryptophan selektiert und 4 Tage bei 30°C inkubiert.

2.6 Herstellung des Expressionsplasmids pheIF3I

Von dem humanen Protein eIF3I (Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1) wurde das Expressionsplasmid pheIF3I (Plasmidkarte siehe Anhang) hergestellt. Dafür wurde aus Referenz-RNA (Universal Human Reference RNA, Agilent Technologies) durch reverse Transkription mit Oligo-dT-Primern und Superscript II Reverse Transkriptase (RT) (Invitrogen, Karlsruhe) eine cDNA hergestellt. Hierzu wurden 1 µg Referenz-RNA mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl verdünnt und mit 1 µl Oligo-dT-Primer (500 µg/ml) und 1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM) gemischt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 65°C erhitzt und rasch auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation wurden 4 µl des 5xFirst-Strand Puffers (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei RT; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µl DTT (0.1 M) und 1 µl RNaseOUT (40 units/µl) hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Nun wurden 1 µl (200 Units) der SuperScript II RT hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Es folgte eine Inkubation für 50 Minuten bei 42°C. Zur Inaktivierung der Reaktion wurde der Ansatz für 15 Minuten auf 70°C erhitzt.

Mittels PCR wurde die eIF3i-cDNA amplifiziert. Als Primer wurden heIF3i-4.EcoRI.s (Primer A) und heIF3i.STOP+5.XhoI.a (Primer B) verwendet.

PCR-Ansatz à 25 µl	
H ₂ O	13,5 µl
5x GC-Puffer	5 µl
cDNA (1:10)	2,5 µl
dNTPs (2,5 mM)	2,5 µl
Primer A: helF3i.-4.EcoRI.s (20 pmol/µl) (ACCAAGAATTCCGGGATGAAGCCGATCCTAC)	0,625 µl
Primer B: helF3i.STOP+5.XhoI.a (20 pmol/µl) (CAACTCGAGCCAGCTTCTTAAGCCTCAAACCTC)	0,625 µl
Phusion	0,25 µl

PCR-Programm, Deckeltemperatur 104°C		
1)	98°C	30 Sek
2)	98°C	10 Sek
3)	55°C	30 Sek
4)	72°C	45 Sek
5)		go to 2 > 35 x
6)	72°C	90 Sek (doppelte Zeit von 4)
7)	8°C	Hold

Das Amplifikationsprodukt wurde mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) aufgereinigt, mit EcoRI HF und XhoI verdaut, auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt und mit dem Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

	30 µl PCR-Produkt	2,5 µl (2,5 µg) pcDNA3.1
Eco RI HF	1,5 µl	1,5 µl
XhoI (20 pmol/µl)	1,5 µl	1,5 µl
CutSmart Puffer	6 µl	6 µl
10x BSA	6 µl	6 µl
H ₂ O	15 µl	42,5 µl
	= 60 µl	= 60 µl

Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Der Vektor und das Insert wurden in molarem Verhältnis 1:3 im Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 Unit T4-DNA-Ligase in 1xLigase-Puffer über Nacht bei RT ligiert. 10 µl wurden für die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen (Inoue et al., 1990) verwendet. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agar ausplattiert. Am nächsten Tag wurden mit einzelnen Kolonien 3 ml LB-Amp-Flüssigkulturen angeimpft und über Nacht bei 37°C angezogen. Die DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß der Anleitung extrahiert und durch Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert.

2.7 Zellkultur mit Säugerzellen und Transaktivierungsassays

2.7.1 Herstellung von Steroid-freiem fetalen Kälberserum (DCC-FCS)

Da Kälberserum verschiedene Hormone enthält, die sich auf die Transaktivierungsassays auswirken können, mussten die COS-1- und HeLa-Zellen für unsere Assays in Medium mit Steroid-freiem Kälberserum herangezogen werden. Für die Herstellung des DCC-FCS (Dextran coated charcoal – fetal calf serum) wurde zunächst eine Suspension aus 200 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer, 5 g Aktivkohle und 0,5 g Dextran hergestellt. Die Suspension wurde bei 4°C über Nacht gerührt, wodurch die Aktivkohle das Dextran adsorbierte. Am nächsten Tag wurde die Suspension in vier 50 ml Röhren aliquotiert, für 10 Minuten bei 2700 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Nun wurden zwei Kohle-Pellets mit 500 ml FCS resuspendiert und die Mischung wurde für 2 Stunden bei 0°C langsam gerührt. Die mit Dextran

umhüllte Aktivkohle adsorbierte hierbei selektiv die hormonellen Bestandteile und kleinere Verunreinigungen des FCS. Durch das Absaugen durch einen Filter wurde die Kohle entfernt. Die zweistündige Inkubation wurde mit den beiden übrigen Kohle-Pellets wiederholt und die Kohle durch einen Filter 2 Mal abgesaugt. Das nun von seinen hormonellen Anteilen befreite FCS wurde 3 Mal steril filtriert und in 50 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

2.7.2 Medien für die Zellkultur

Nach entsprechender Anleitung wurde Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM, Sigma) hergestellt. DMEM-Pulver für 5 l wurden mit 6 g NaHCO₃ (MG 84,01 g) in 5 l destilliertem H₂O steril filtriert und bei 4°C gelagert. Zu 500 ml DMEM mit pH 7,3 wurde 50 ml DCC-FCS gegeben. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Vor Verwendung des Mediums wurde dieses im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.7.3 Auftauen und Anziehen der Säugerzellen

Die Säugerzellen (COS-1- und HeLa-Zellen) wurden aus flüssigem Stickstoff im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in 10 ml 37°C warmen Medium aufgenommen. Es folgte die Abzentrifugation für 10 Minuten bei 1500 rpm und die Überführung in frisches Kulturmedium, um Reste des DMSO-haltigen Einfriermediums zu entfernen. Die Zellen wurden nun mit 30 ml Kulturmedium auf Zellkulturflaschen der Größe 175 cm² verteilt. Das Nährmedium wurde 3 Mal wöchentlich gewechselt. Die Zellkulturflaschen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.7.4 Trypsinieren und Zählen der Säugerzellen

Beide verwendeten Zelllinien haben eine hohe Teilungsrate, so dass die 175 cm²-Flaschen beim Aussäen von 2 Millionen Zellen nach 2-4 Tagen zu 90% die Oberfläche bedeckten. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zunächst mit 37°C warmem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden sie kurz mit 3 ml 0,05% Trypsin-EDTA inkubiert, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Die Reaktion wurde mit 10 ml Serum-haltigem Kulturmedium angehalten und die Zellen wurden in ein Harre-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, in frisches Kulturmedium aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Für die Transfektionen ist die Aussaat einer

definierten Zellzahl wichtig, so dass hierfür die Zellen 1:1 mit Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt wurden.

2.7.5 Einfrieren der Säugerzellen

Nach der Trypsinierung der Zellen wie oben beschrieben, wurden die Zellen nach der Zentrifugation in 1,5 ml kühles Einfriermedium (DMEM mit 10% DMSO) aufgenommen und mit dem Nalgene-Cryo-Einfriergerät im -80°C Gefrierschrank um 1°C pro Minute heruntergekühlt. Nach 24 Stunden erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff. Gelagert wurden die Zellen bei -196°C.

2.7.6 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Als transiente Transfektion wird das zeitweilige Einbringen von Fremd-DNA oder RNA in tierische oder eukaryotische Zellen bezeichnet. In unseren Versuchen wurde das lipidbasierte Multikomponenten Transfektionsreagenz FuGene HD (Roche) verwendet. Das Reagenz bildet mit der Plasmid-DNA Lipid-DNA-Komplexe aus, die mit der Zellmembran fusionieren. So kann die Fremd-DNA in das Zellinnere gelangen.

2.7.7 Transaktivierungsassays (Dual-Luziferase-Assays)

Um zu untersuchen, ob eIF3i als Koregulator des ARs wirkt, also aktivierend oder reprimierend auf die Androgen-abhängige Transaktivierung des ARs wirkt, haben wir sogenannte Dual-Luziferase-Assays in HeLa- und COS-1-Zellen durchgeführt.

Um die Grundaktivität des ARs in den Zellen zu messen, wurden die Zellen mit dem Expressionsplasmid des ARs (pSVAR0; siehe 1.5.2), dem Reportervektor (ARE)₂-TATA (siehe 1.5.3) und pRG-TK (siehe 1.5.4) kotransfiziert. Die generelle Aktivierung des ARs erfolgte durch Zugabe von DHT. Parallel erfolgte die Kotransfektion der Zellen mit einem zusätzlichen Plasmid für die Expression von eIF3i (pheIF3i) oder dem leeren Expressionsvektor als Negativkontrolle.

Der (ARE)₂-TATA-Reportervektor exprimiert die Leuchtkäfer-Luziferase (aus *Photinus pyralis*) unter Kontrolle des ARs. Je stärker die Transkription induziert wurde, desto mehr Luziferase wurde exprimiert und konnte nach Zugabe eines Substrates in Form einer Lichtreaktion im Luminometer gemessen werden. Ein Koaktivator würde in einem Transaktivierungsassay folglich eine Erhöhung des

Lichtsignals bewirken und ein Korepressor eine Verringerung des Signals (siehe Abbildung 11).

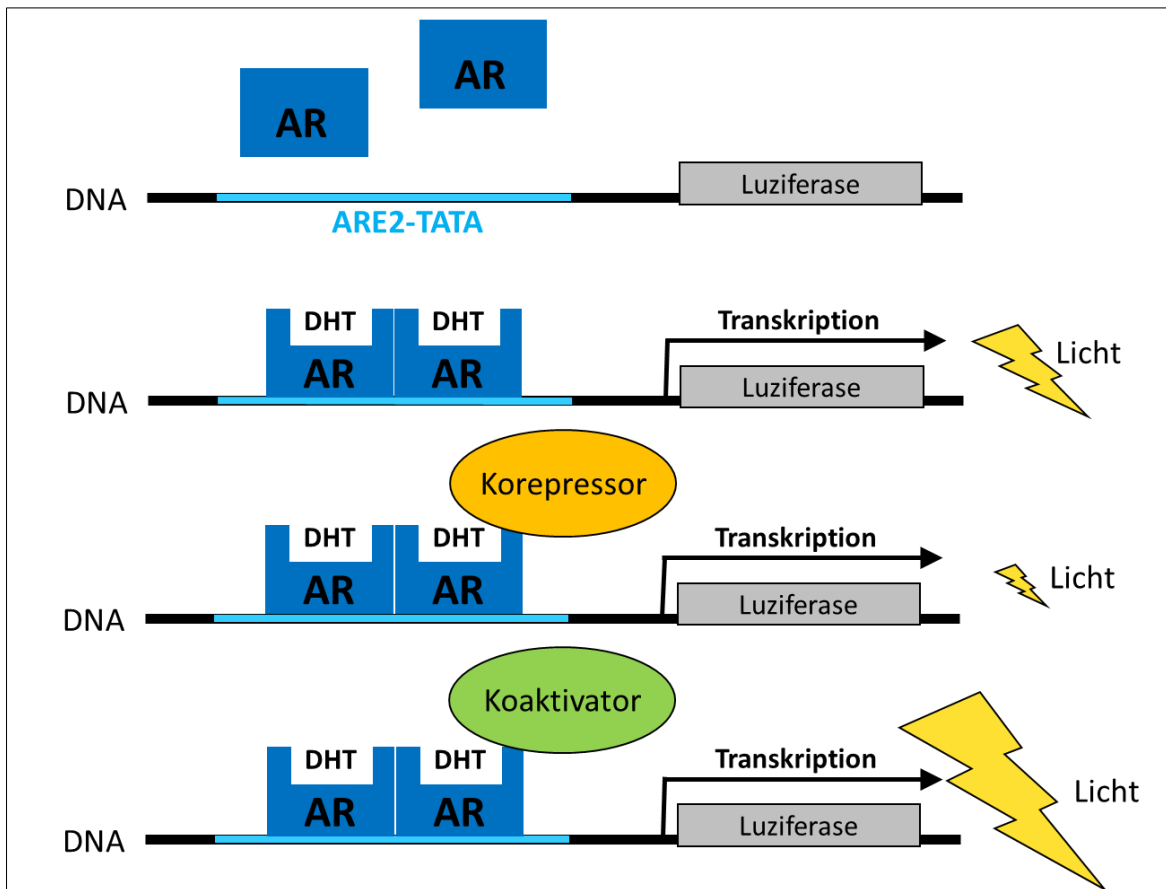


Abbildung 11: Prinzip des Transaktivierungsassays

Der Reportervektor (ARE)₂-TATA enthält ein Luziferase-Gen als Reporter. Oberhalb des Reportergens liegt jeweils eine spezifische Promotorregion, die durch den AR aktiviert werden kann. Bei Bindung des ARs an den Promotor kommt es zur Transkription der Luziferase und nach Zugabe eines Substrates kann die Stärke der Transkription als Lichtreaktion im Luminometer gemessen werden. Ein Koaktivator würde entsprechend eine Erhöhung des Lichtsignals, ein Korepressor eine Verringerung des Signals hervorrufen.

Um verschiedene Versuche vergleichbar machen zu können, wurde das Plasmid pHRG-TK für die konstitutive Expression der Luziferase von *Renilla reniformis* kotransfiziert. Nach Lysieren der Zellen wurde mit dem Dual-Luciferase[®]-Reporter-Assay-System von Promega die Aktivität der beiden Luziferasen sukzessiv detektiert. Die Aktivitäten der Luziferasen werden mit Hilfe von zwei Reagenzien im Luminometer nachgewiesen. Das erste Reagenz, das Luziferase-Assay-Reagenz-II, enthält das Leuchtkäfer-Luziferin sowie ATP und Mg²⁺. Die Leuchtkäfer-Luziferase katalysiert die unter Abbildung 12 A dargestellte Oxidation,

bei der Licht entsteht, welches im Luminometer gemessen wird und welches mit der Expression des Reportergens pFR-Luc korreliert. Das zweite Reagenz, das Stop&Glow-Reagenz, enthält Coelenterazin, welches von der Renilla-Luziferase ebenfalls oxidiert wird (siehe Abbildung 12 B). Auch bei dieser Reaktion wird Licht emittiert.

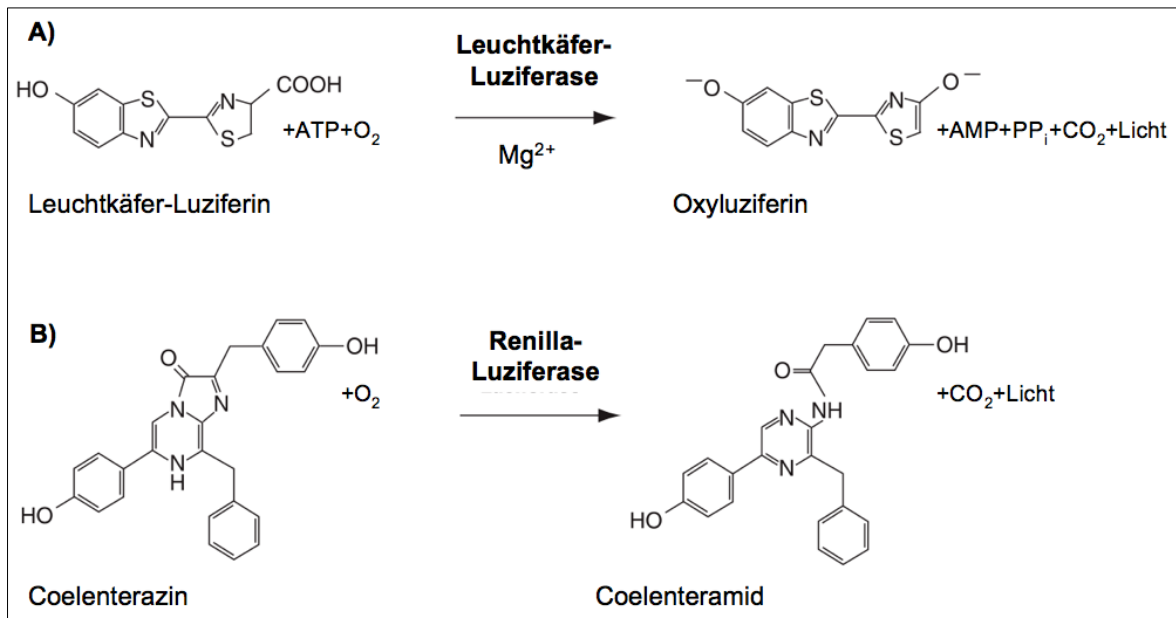


Abbildung 12: Luziferase-Reaktionen

(modifiziert nach: <https://www.promeconnections.com/dual-luciferase-or-dual-glo-luciferase-assay-system-which-one-should-i-choose-for-my-reporter-assays/>; Stand 16.05.18, 14:06 Uhr)

Mit Hilfe von zwei Reagenzien werden die Aktivitäten der Luziferasen im Luminometer detektiert. Das Luziferase-Assay-Reagenz-II enthält das Leuchtkäfer-Luziferin sowie ATP und Mg²⁺. Die Leuchtkäfer-Luziferase katalysiert die unter A) dargestellte Oxidation. Bei der Oxidation entsteht Licht, welches im Luminometer gemessen wird und mit der Expression des Reportergens pFR-Luc korreliert. Das Stop&Glow-Reagenz quenched die erste Reaktion und enthält Coelenterazin, das von der Renilla-Luziferase ebenfalls oxidiert wird B). Auch bei dieser Reaktion wird Licht emittiert. Die Renilla-Luziferase wurde konstitutiv über eine Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK)-Promotor exprimiert. Die gemessene Aktivität der Renilla-Luziferase wurde für die Normalisierung nach Transfektionseffizienz verwendet.

Durch Bildung des Quotienten aus der Aktivität der Leuchtkäfer-Luziferase und der *Renilla*-Luziferase konnten die Ergebnisse nach der Transfektionseffizienz normalisiert werden.

2.7.7.1 Protokoll Transaktivierungsassay

Die Versuche wurden jeweils in Triplikaten mit drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt.

80.000 COS-1- bzw. 50.000 HeLa-Zellen wurden in Greiner bio-one-CELLSTAR-24-Well-Platten in 500 µl Kulturmedium (DMEM + DCC-FCS) pro Well ausgesät. Über Nacht wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag. Pro Well wurden die Zellen mit 30 ng des Expressionsplasmids des nukleären Rezeptors (pSVAR beim AR, pGR beim GR), 200 ng Reporter gen (ARE)₂-TATA, 75 ng des eIF3I Expressionsplasmids oder der leere Vektor pcDNA3.1 und 5 ng Renilla-Luziferase-Expressionsplasmid pHRG-TK mit 0,65 µl Fugene HD (Promega, Madison, WI, USA) transfektiert. Um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, wurde zunächst das FuGene HD bei RT für 5 Minuten in DMEM inkubiert und dann die DNA zugegeben. Nach weiteren 20 Minuten wurde das DMEM-FuGene-DNA-Gemisch, in dem sich inzwischen Lipid-DNA-Komplexe ausgebildet hatten, auf die Wells gegeben. Die Komplexe fusionierten nun mit den Zelloberflächen und die Plasmid-DNA wurde in das Zellinnere aufgenommen. Es folgte eine fünfständige Inkubation im Brutschrank. Während dieser Zeit wurde die Plasmid-DNA in den Zellkern transferiert und die Gene der aktiven Promotoren transkribiert und translatiert. Anschließend wurden die Zellen für 18 Stunden mit 10 nM DHT bzw. 5 µl/well Ethanol mit DMEM als Negativkontrolle (5 µl Ethanol mit 495 serumfreien DMEM Medium mischen) inkubiert.

Für die Zellyse wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Wells 2 Mal mit je 1 ml PBS gespült. Pro Well wurden 100 µl eiskalter Lysis-Puffer M-Per (Herstellung: Lysis-Puffer M-Per (Thermo Scientific, Karlsruhe) 5-7 ml + 1 Tablette Complete mini EDTA free) (Roche, USA) zugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei RT auf einem Schüttler wurden je 25 µl der Lysate in eine Costar-Assay-Plate (96-Well; Corning, USA) überführt.

Die Messung im Luminometer-Lucy-3 (Anthos Mikrosysteme, Krefeld, Deutschland) wurde mit dem Dual-Luziferase-Reporter-Assay-System (Promega, Madison, WI, USA) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Programm für die Detektion der Luziferasen im Luminometer	
25 µl	Zellysat
50 µl	Luziferase Assay Reagent II
10 s	Messung der Leuchtkäfer- Luziferase Aktivität
3 s	Pause
50 µl	Stop&Glow Reagenz
10 s	Abstoppen der Reaktion und Messung der Renilla-Luziferase Aktivität
3 s	Pause und Einstellen des nächsten Wells

Die Aktivitäten der Luziferasen werden mit Hilfe von zwei Reagenzien im Luminometer detektiert. Das erste Reagenz, das Luziferase-Assay-Reagenz-II, enthält das Leuchtkäfer-Luziferin sowie ATP und Mg^{2+} . Die Leuchtkäfer-Luziferase katalysiert die unter Abbildung 12 A dargestellte Oxidation, bei der Licht entsteht, welches im Luminometer gemessen wird und welches mit der Expression des Reportergens pFR-Luc korreliert. Das zweite Reagenz, das Stop&Glow-Reagenz, enthält Coelenterazin, welches von der Renilla-Luziferase ebenfalls oxidiert wird (siehe Abbildung 12 B). Auch bei dieser Reaktion wird Licht emittiert. Die Renilla-Luziferase wurde konstitutiv über eine Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK)-Promotor konstitutiv exprimiert. Die gemessene Aktivität der Renilla-Luziferase wurde für die Normalisierung nach Transfektionseffizienz verwendet.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Excel (Microsoft, USA). Die Androgen-abhängige Aktivität der Leuchtkäfer-Luziferase wurde in Beziehung zur Transfektionseffizienz, die der Renilla-Luziferase-Aktivität entsprach, gesetzt:

$$\text{Korrigierte Leuchtkäfer-Luziferase-Aktivität} = \frac{\text{Aktivität der Leuchtkäfer-Luziferase}}{\text{Aktivität der Renilla-Luziferase}}$$

Für jeden Transfektionsansatz wurde die pSVAR0-Aktivität des AR-Wildtyps bei Zugabe von 10 nM DHT als Triplikat-Ansatz bestimmt und als 1 festgelegt. Gegen

diesen Wert wurden alle anderen Aktivitäten normalisiert. Hierdurch konnten interexperimentelle Schwankungen ausgeglichen werden.

Normalisierte Luziferaseaktivität =

Aktivität des Konstruktes bei Hormonkonzentration X

Mittelwert pSVAR0 bei 10 nM DHT

2.8 Immunhistochemie mit dem Antikörper anti-eIF3i

Um nachzuweisen, dass das Protein eIF3i im Hoden und Genitalhöcker der Maus exprimiert wird, wurden Genitalhöcker-Querschnitte von männlichen Maus-embryonen des Entwicklungsstadiums E16 (Box E16/3, 13.04.2010, Male, Objektträger Nr. 40 & 43) mit einem eIF3i-spezifischem Antikörper immunhistologisch angefärbt. Als Antikörper wurde anti-eIF3i (HPA029939, Sigma-Aldrich) verwendet.

Zunächst erfolgte die Fixierung der Gewebeprobe. Hierzu wurde das Gewebe mit PBS gewaschen und 24 Stunden in 4% PFA/PBS bei 4°C fixiert. Die Paraffin-Einbettung wurde freundlicherweise maschinell durch unser Pathologisches Institut durchgeführt, ebenso wie das Schneiden des Paraffin-Blocks in 5 µm-Schnitte. Die Schnitte wurden auf positiv geladene oder auf mit Silan beschichtete Objektträger befestigt und mussten vor der Entfernung des Paraffins gut getrocknet sein. Für die Entfernung des Paraffins mussten jeweils zwei Bäder mit EZ-DeWax und Optimax-Waschpuffer vorbereitet werden. Während der EZ-DeWax mehrmals verwendet werden durfte, war der Waschpuffer nur zum einmaligen Gebrauch geeignet. Der Objektträger wurde für 5 Minuten in das 1. Bad mit EZ-DeWax getaucht und gelegentlich geschwenkt. Dann wurde der Objektträger in das 2. Bad mit EZ-DeWax für 5 Minuten überführt und gelegentlich geschwenkt. Im Anschluss wurde der Objektträger gründlich mit autoklaviertem H₂O abgespült. Dann wurde der Objektträger für 5 Minuten in das 1. Bad mit Optimax-Waschpuffer getaucht und gelegentlich geschwenkt. Es folgte die Überführung in das 2. Bad mit Optimax-Waschpuffer für weitere 5 Minuten, mit gelegentlichem Schwenken. Die Objektträger mussten ab diesem Zeitpunkt vor Austrocknung geschützt werden.

Nun folgte die Antigen-Rückfaltung. Hierfür wurde der Tris-EDTA-Puffer (Antigen Retrieval Buffer, pH 9) in einem Objektträgergestell aus Glas im 97°C-Wasserbad erhitzt.

Nachdem die Temperatur des Puffers überprüft wurde, wurden die Objektträger für 30 Minuten in dem Puffer im Wasserbad inkubiert. Dann wurde das Objektträgergestell mit dem Puffer und den Objektträgern aus dem Wasserbad genommen und für 20 Minuten bei RT abgekühlt. Im Anschluss wurden die Objektträger kurz in TBS getaucht und dann jeweils 2 x 5 Minuten in TBS + 0,025% Triton X-100 in 50 ml Falconröhrchen geschüttelt. Die Objektträger wurden abgeklopft und vorsichtig trocken getupft, wobei die Gewebeprobe nicht berührt werden durfte. Die Schnittpräparate wurden nun so nah wie möglich an der Gewebeprobe mit einem DakoPen eingekreist.

Für das Blocken wurde folgende Lösung angesetzt (ergibt 1000 µl): 100 µl 10% BSA, 100 µl 10xTBS, 100 µl goat serum (10% normales Serum, gleiche Spezies wie der zweite Antikörper), 700 µl autoklaviertes H₂O. Jeweils ca. 100 µl der Lösung wurden in den Kreis auf die Gewebeprobe gegeben und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger vorsichtig abgeklopft und mit Papier abgetupft, wobei die Gewebeprobe nicht berührt werden darf.

Es wurden verschiedene Verdünnungen des primären Antikörpers, eine Kontrolle und ein Ansatz mit dem AR vorbereitet und bei RT aufbewahrt.

	1:400	1:800	1:1.600	Kontrolle	AR 1:100
10% BSA	40 µl	40 µl	80 µl	40 µl	20 µl
10xTBS	40 µl	40 µl	80 µl	40 µl	20 µl
anti-eIF3i	1 µl	0,5 µl	0,5 µl	-	AR 2 µl
H ₂ O	320 µl	320 µl	640 µl	320 µl	160 µl

Es wurden jeweils ca. 100 µl auf die Objektträger in den Kreis mit der Gewebeprobe gegeben und diese wurden über Nacht in der Feuchtkammer bei 4°C inkubiert.

Die Abbildung 13 zeigt die Anordnung der Verdünnungen auf den Objektträgern.

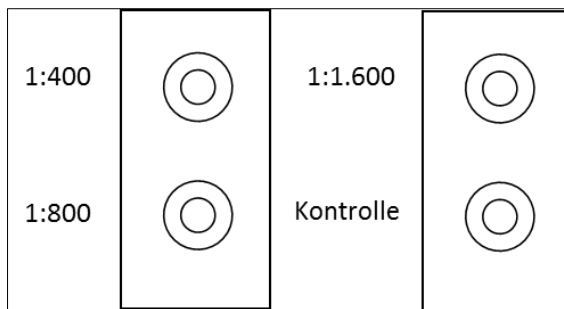


Abbildung 13: Anordnung der Verdünnungen des primären Antikörpers auf den Objektträgern

Nun wurden die Objektträger aus der Feuchtkammer genommen und mit TBS + 0,025% Triton abgespült. Dann wurden sie jeweils 2 x 5 Minuten in TBS + 0,025% Triton X-100 geschüttelt. Die Objektträger wurden abgeklopft und die Umrandung um die Gewebeprobe herum wurde nachgezogen.

Es folgte die Anti-Peroxidase-Behandlung. Dieser Schritt konnte ausgelassen werden, wenn er nicht gefordert war. Er wurde immer nach der ersten Antikörper-Behandlung durchgeführt, da die Behandlung mit 0,3% H₂O₂ endogene Peroxidasen zerstört, die sonst unspezifische Signale geben würden. Hierbei wurden die Objektträger in 0,3% H₂O₂ in TBS für 15 Minuten oder in Peroxidase Suppressor aus dem Pierce Peroxidase Detection Kit inkubiert. Jetzt wurde weiter nach dem Protokoll mit dem Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, USA) verfahren.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (anti-rabbit, Sigma-Aldrich). 1 ml des verdünnten zweiten Antikörpers (biotinylated secondary antibody) wird in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und es wurden 20 µl des Goat Serums hinzugefügt. Diese Mischung wurde dann in den Kreis auf die Gewebeprobe gegeben und für eine Stunde in der Feuchtkammer inkubiert.

Im Anschluss wurden die Objektträger 2 x 5 Minuten in TBS und 5 Minuten in TBS + 0,05% Tween (= Waschpuffer, pro 1 l TBS 0,5 ml Tween hinzugeben) geschüttelt.

Nun folgte die Inkubation mit dem ABC-Reagenz. Dieses sollte 30 Minuten vor der Verwendung angesetzt werden. Hierfür wurden 1 ml TBS-Puffer (900 µl H₂O & 100 µl 10xTBS) mit 2,8 µl Reagenz A (Avidin) und 2,8 µl Reagenz B (Biotinylierte

Peroxidase) gemischt. Die Objektträger wurden mit dem ABC-Reagenz für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger 2 x 5 Minuten in TBS + 0,05% Tween geschüttelt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit DAB-Substrat (Pierce Peroxidase Detection Kit). Das DAB/Metal-Konzentrat wurde in einem -20°C Gefrierschrank aufbewahrt und zunächst vor Gebrauch gut gemischt. Nach Entnahme der benötigten Menge musste das Konzentrat schnell wieder in den Gefrierschrank zurückgestellt werden. Für die Herstellung von 600 µl DAB-Substrat wurden 540 µl stable peroxide buffer und 60 µl des DAB/Metal-Konzentrats gut gemischt. Die Objektträger wurden mit dem Konzentrat offen für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde der Rest des Konzentrats vorsichtig mit einem Papiertuch aufgesaugt. Im Anschluss wurden die Objektträger 3 Mal kurz mit Leitungswasser in 50 ml Falconröhrchen geschüttelt.

Zur Dehydration wurden die Objektträger in aufsteigenden Ethanol-Konzentrationen jeweils für 3 Minuten in 50%, 70%, 95% und 2 x 100% Ethanol geschüttelt. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und die Stift-Rückstände um die Gewebeprobe herum so gut wie möglich entfernt.

Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe des Einbettungsmediums (Pierce Peroxidase Detection Kit). Bei RT wurden 1-3 Tropfen des Mounting Mediums auf die trockene Gewebeprobe gegeben und vorsichtig mit Abdeckplättchen bedeckt. Die Objektträger sollten bei RT 1-2 Stunden auf flacher Oberfläche trocknen und konnten anschließend im dem Olympus CKX41 Mikroskop mit Olympus Kamera XC50 (5MP) (Olympus, Ulm, Deutschland) begutachtet werden. Als Software wurde Cell Imaging (Olympus, Ulm, Deutschland) verwendet.

III Ergebnisse

1. Y-spezifische PCR

Da nur mit männlichen GTs weitergearbeitet wurde, wurde aus Gewebe des Schwanzes von 16 Mausembryonen mittels Y-spezifischer PCR (Wang et al., 2001) das Geschlecht bestimmt. Hierbei konnten 7 männliche Mausembryonen (siehe Abbildung 14) identifiziert werden, deren Proben ein Y-spezifisches PCR-Produkt im Bereich von 184 bp zeigten.

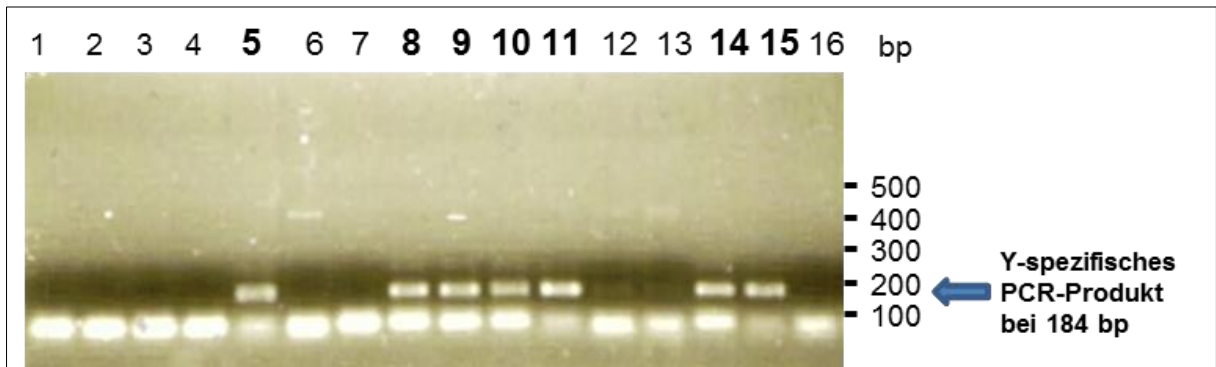


Abbildung 14: Ergebnis der Y-spezifischen PCR von 16 Gewebeproben des Schwanzes von Mausembryonen des Entwicklungsstadiums E16.

Bei den Embryonen 5, 8, 9, 10, 11, 14 und 15 handelt es sich um männliche Embryonen, da das Y-spezifische PCR-Produkt im Bereich von 184 bp (siehe Pfeil) amplifiziert wurde.

2. Yeast-Two-Hybrid-Screening

Mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Screenings wurden für das Entwicklungsstadium E16 insgesamt etwa 400.000 Klone untersucht. Hierbei handelt es sich um die Anzahl aller transformierten Zellen. Die Zahl wurde berechnet, indem ein Aliquot der transformierten Zellen des Screenings auf SDC-Leu-Trp-Medium gegeben wurde. Auf diesem Medium konnten alle transformierten Zellen wachsen. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C wurde die Zellzahl auf der Platte bestimmt und mit dem Faktor X ($X = \text{Gesamtvolumen transformierte Zellen} : \text{Volumen des Aliquots}$) multipliziert.

1/3 der isolierten Klone, also 133.000 Klone, lagen im Leseraster und konnten so auf ihre Interaktion mit dem AR untersucht werden. Nach 6 Tagen auf selektivem Medium (SDC-4AS + DHT) wuchsen insgesamt 328 Kolonien. Die Platten wurden jeden Tag auf Kolonien untersucht und die zuerst deutlich zu erkennenden 200 Kolonien wurden gepickt. Die 200 Klone wurden erneut auf -4AS+DHT und

zusätzlich als Kontrolle auf -4AS ohne DHT Platten ausgestrichen. 190 Klone wuchsen erneut auf dem selektiven Medium. 71 dieser Klone wuchsen auch auf Medium ohne DHT. Diese Klone wurden nicht weiter analysiert.

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden außerdem Yeast-Two-Hybrid-Screenings der Entwicklungsstadien E15 und E17 (Screening A und Screening C) durchgeführt. So wurden zusammen mit dem Screening des Entwicklungsstadiums E16 (Screening B) ca. 400.000 cDNA-Klone, die im Leseraster lagen, auf eine Interaktion mit dem AR untersucht. Auch bei den Screenings E15 und E17 wurden jeweils 200-250 Hefeklone isoliert, die Androgen-abhängig auf selektivem Medium Wachstum zeigten (siehe Abbildung 15).

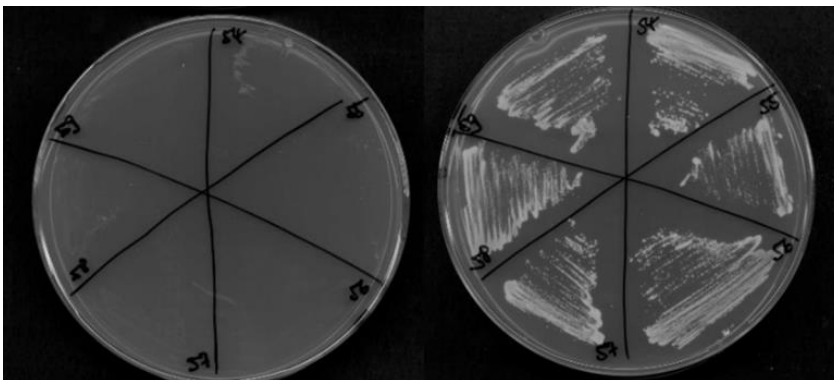


Abbildung 15: Isolierte Klone 54-59 des Yeast-Two-Hybrid-Screenings E16.

Erneut ausgestrichene Klone auf SDC-4AS ohne (links) oder mit DHT (rechts) nach 4 Tagen.

3. Sequenzierung

Von den 200 isolierten Klonen des Entwicklungsstadiums E16 lagen 126 innerhalb und 74 Klone außerhalb des Leserasters der Gal4-Aktivierungsdomäne im Prey-Plasmid. Das heißt 126 Prey-Plasmide kodierten einen ORF, bei dem die Gal4-Aktivierungsdomäne mit dem folgenden Gen X als Fusionsprotein abgelesen werden konnte. In den drei unabhängigen Screenings konnten insgesamt 16 bekannte Koregulatoren des ARs identifiziert werden. Es handelt sich um AATF/Rb-binding protein Che-1, AES, Alpha-Aktinin 2, Alpha-Aktinin 4, ARA55, Beta-Aktin, Beta-Catenin, Foxo1, Gelsolin, Hsp40, Pias1, Psmc3, Rack1, SRC-1, SRC-3 und Ubc9 (siehe Tabelle 1). Beta-Aktin wurde z. B. insgesamt 6 Mal isoliert mit einer maximalen Länge von 189 AS und einer minimalen Länge von 130 AS bis zum Stopcodon. Gelsolin konnte 8 Mal isoliert werden mit einer maximalen

Länge von 563 AS und einer minimalen Länge von 401 AS bis zum Stopcodon. Rack1 wurde 11 Mal isoliert mit einer maximalen Länge von 268 AS und einer minimalen Länge von 139 AS bis zum Stopcodon.

Name	Klon-Nr.	Kodierender Bereich der Klone	Putatives Bindungsmotiv
AATF (apoptosis antagonizing transcription factor), Rb-binding protein Che-1 (human ortholog)	B018_a	aa160-526 (Stop)	3 x LxxLL 1 x FxxLF
AES (Amino-terminal enhancer of split)	A171_b	aa1-197 (Stop)	
	B096_a	aa1-197 (Stop)	
Alpha-Aktinin 2 (Actn2)	A172_a	aa584-894 (Stop)	
	B193_a	aa567-894 (Stop)	
Alpha-Aktinin 4 (Actn4)	C177_b	aa330-912 (Stop)	
ARA55 (Androgen receptor associated protein 55); Hic-5 isoform alpha-B	C067_a	aa33-460 (Stop) der Isoform alpha-B	2 x FxxLF
ARA55 (Androgen receptor associated protein 55), Hic-5, transforming growth factor beta 1 induced transcript	B011_a	aa125-Stop der Isoform alpha-B oder aa109-444 (Stop) der Isoform beta	2 x FxxLF

Name	Klon-Nr.	Kodierender Bereich der Klone	Putatives Bindungsmotiv
Beta-Aktin (Actb)	A057_a	aa222-375 (Stop)	
	A169_a	aa245-375 (Stop)	
	A213_a	aa238-375 (Stop)	
	A248_c	aa195-375 (Stop)	
	B077_d	aa241-375 (Stop)	
	B089_a	aa186-375 (Stop)	
Beta-Catenin	A058_a	aa164-423 (of 781)	4 x LxxLL
Foxo1 (forkhead box 01); forkhead protein 1	A167_a	aa423-652 (Stop)	LkeLL
	B013_a	aa370-652 (Stop)	LkeLL, im Klon
Gelsolin (Gsn)	A048_a	aa380-780 (Stop)	
	B190_a	aa354-780 (Stop)	
	C018_a	aa259-780 (Stop)	FxxFF bei aa387
	C039_a	aa217-780 (Stop)	
	C053_a	aa351-780 (Stop)	
	C086_a	aa379-780 (Stop)	
	C107_a	aa333-780 (Stop)	
	C152_a	aa379-780 (Stop)	
Hsp40 (heat shock protein 40 kD)	B142_a	aa74-340 (Stop)	
Pias1 (Protein Inhibitor of activated STAT 1)	A234_a	aa1-641 (Stop)	LxxLL
Psmc3 (Proteasome 26S Subunit, ATPase 3); TBP-1 (Tat-binding protein-1)	C254_a		

Name	Klon-Nr.	Kodierender Bereich der Klone	Putatives Bindungsmotiv
Rack1 (Receptor for Activated C Kinase 1); Gnb211 (guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1)	A046_a	aa171-317 (Stop)	
	A219_a	aa171-317 (Stop)	
	A243_a	aa144-317 (Stop)	
	B054_a	aa118-317 (Stop)	
	B091_a	aa178-317 (Stop)	
	B114_a	aa120-317 (Stop)	
	B137_a	aa171-317 (Stop)	
	B146_a	aa49-317 (Stop)	
	B151_c	aa130-317 (Stop)	
	B162_a	aa130-317 (Stop)	
	B176_a	aa175-317 (Stop)	
SRC-1 (steroid receptor coactivator-1)	A098_a	aa1315-1447 (Stop)	LQQLL (C-Terminus)
	A126_a	aa1158-1447 (Stop)	LQQLL (C-Terminus)
SRC-3 (steroid receptor coactivator-3); NCoA3 (nuclear receptor coactivator 1)	A185_a	aa627-749 (Stop)	LxxLL
SUMO-conjugating enzyme Ubc9 , Ube2i ubiquitin-conjugating enzyme E2I (Transkript-Variante 3)	A222_a	aa1-158 (Stop)	

Tabelle 1: Bereits bekannte AR-Koregulatoren der Yeast-Two-Hybrid-Screenings E15, E16 und E17 (Screening A, B und C).

Angegeben sind zudem der kodierende Bereich der Klone und falls vorhanden ein putatives Bindungsmotiv, über das eine Interaktion mit dem AR stattfinden kann.

Neben den bekannten Koregulatoren haben wir durch das Screening eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die bei der Kontrolle der Transkription und des Zellzyklus sowie bei der Differenzierung und embryonalen Entwicklungsprozessen eine Rolle spielen. Die identifizierten Maus-Proteine und ihre humanen Orthologe wurden auf konservierte AR-Bindungsmotive (FxxLF-, FxxFF-, FxxMF- und LxxLL-Motive) untersucht. Aufgrund der vorhandenen Bindungsmotive, der bestehenden Kenntnisse über die Proteine und einer mehrfachen Isolierung in den Screenings wurden aus dem Screening des Entwicklungsstadiums E16 insgesamt 6 Proteine als potentielle Koregulatoren des ARs eingestuft. Es handelt sich um die Proteine BAF45a, CapG, eIF3I, Rwdd1, Trip6 und Znf12. Rwdd1 wurde von uns bereits als Koaktivator des ARs veröffentlicht (Grötsch et al., 2012) und wird daher im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht diskutiert. Tabelle 2 fasst für die anderen Proteine zusammen, wie oft die entsprechenden Klone in dem Screening E16 isoliert wurden, ob die Proteine ein in Maus und Mensch konserviertes AR-Bindungsmotiv beinhalten und welche Bereiche des Proteins in den cDNA-Klonen enthalten waren.

Das Protein eIF3i (Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1) wurde 15 Mal mit unterschiedlicher Länge isoliert, so dass wir uns entschieden, vor allem mit diesem Protein weiterzuarbeiten. Klon B008_b war mit 190 AS (AS 135 bis 325) der längste, B029_a mit 74 AS (AS 251-325) der kürzeste Klon.

Protein	Iso- lierte Klone	Putatives Bindungs- motiv	Bereich des ORFs in den Klonen
Baf45a (BRG1-associated factor 45KDa); Phf10 (PHD finger protein 10, Ph10)	1		aa240-497 (von 497)
CapG (capping protein, actin filament)	1	340-FxxFF-346	aa207-349 (von 349)

Protein	Iso- lierte Klone	Putatives Bindungs- motiv	Bereich des ORFs in den Klonen
eIF3i (Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1)	15	120-FxxFF-126	längster Klon: aa135-235 (von 325) kürzester Klon: aa251-325 (von 325)
Trip6 (thyroid hormone receptor interactor 6)	1		aa109-480 (von 480)
Znf12 (zink finger protein 12); homolog zu humanem ZNF325	2		aa503-654 (von 654)

Tabelle 2: Im Yeast-Two-Hybrid-Screening E16 identifizierte potenzielle AR-Koregulatoren.

Neben dem/den Namen des Proteins sind die Anzahl der isolierten Klone, das putative AR-Bindungsmotiv und der kodierende Bereich der Klone angegeben.

4. Retransformationen

Die Plasmide der bekannten Koregulatoren wurden mit Hilfe der LiOAc-Transformation in den Hefestamm AH109 mit dem Bait-Plasmid pGBK_AR555 retransformiert. Die Plasmide induzierten erneut Wachstum auf selektivem Medium mit DHT, aber nicht auf Medium ohne DHT (siehe Abbildung 16).

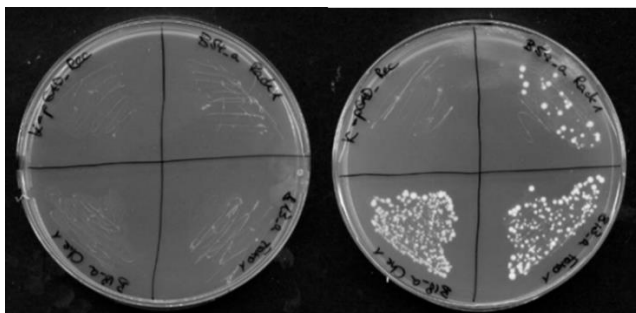


Abbildung 16: Retransformation von Plasmiden bekannter Koregulatoren

Das leere Plasmid pGAD (als Negativkontrolle) und aus dem Screening isolierte Plasmide der bekannten Koregulatoren Rack1, Che-1 und Foxo-1 wurden mit dem Bait-Plasmid pGBK_AR555 retransformiert. Die Abbildung zeigt das Wachstum der Hefezellen nach 6 Tagen auf SDC-4AS ohne (links) oder mit DHT (rechts).

Auch die von uns als mögliche AR-Koregulatoren eingestuft Plasmide wurden weiter durch Retransformationen überprüft. Die Plasmide wurden zusammen mit pGBK_AR555, pGBK_AR618, pGBK_AR645 und dem leeren Vektor pGBK als Negativ-Kontrolle in den Hefestamm AH109 retransformiert (siehe Abbildung 17).

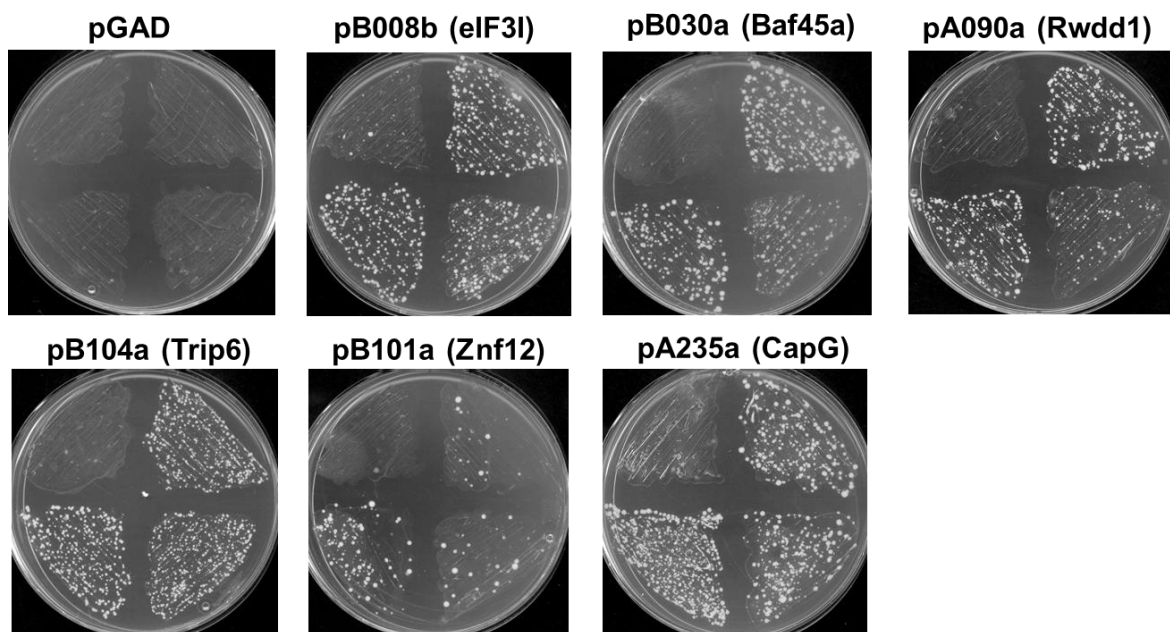
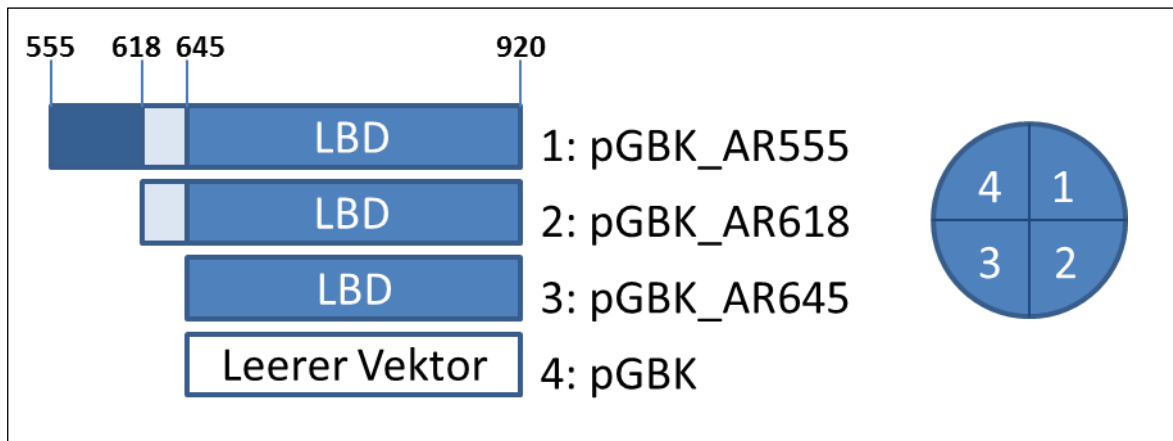


Abbildung 17: LiOAc-Transformation interessanter Prey-Plasmide

Oben: Schematische Darstellung der für die LiOAc-Transformation verwendeten Baits und deren Anordnung in der Petri-Schale.

Bei dem Bait 1 handelt es sich um das im Screening verwendete Bait pGBK_AR555, welches sowohl die DBD, die Hinge Region als auch die LBD beinhaltet. Bait 2 (pGBK_AR618) und Bait 3 (pGBK_AR645) sind kürzer, Bait 4 ist der leere Vektor pGBK. Dunkelblau = DBD; Hellblau=Hinge-Region; Blau=LBD.

Unten: Retransformation interessanter Prey-Plasmide (Baf45a, CapG, eIF3i, Rwdd1, Trip6, Znf12)

mit den Bait-Plasmiden pGBK_AR555, pGBK_AR618, pGBK_AR645 und pGBK als Negativ-Kontrolle. Als weitere Negativ-Kontrolle wurden dieselben Bait-Plasmide mit dem leeren Prey-Plasmid pGAD transformiert. Die Abbildung zeigt das Wachstum der Hefezellen nach 6 Tagen auf SDC-4AS+DHT.

Die meisten der untersuchten Prey-Plasmide waren auch nach erneuter Retransformation in der Lage, ein DHT-abhängiges Wachstum der Hefen zu induzieren. Es zeigt sich in den Retransformationen, dass die LBD des ARs, also das Bait pGBK_645, ausreicht, um das Wachstum der Hefen zu erreichen. Die LBD allein kann also eine Proteininteraktion zu den untersuchten Preys ausbilden. In Abbildung 17 unten sind exemplarisch Retransformationen der von uns als interessant eingestuften Proteine Baf45a, CapG, eIF3i, Rwdd1, Trip6 und Znf12 der Screenings E15 und E16 dargestellt.

Da bei dem Yeast-Two-Hybrid-Screening des Entwicklungsstadiums E16 insgesamt 15 Mal das Protein eIF3i nachgewiesen wurden, entschieden wir uns, hier weitere Kontrollen durchzuführen. Abbildung 18 zeigt die erfolgreiche LiOAc-Transformation verschiedener eIF3i-Klone.

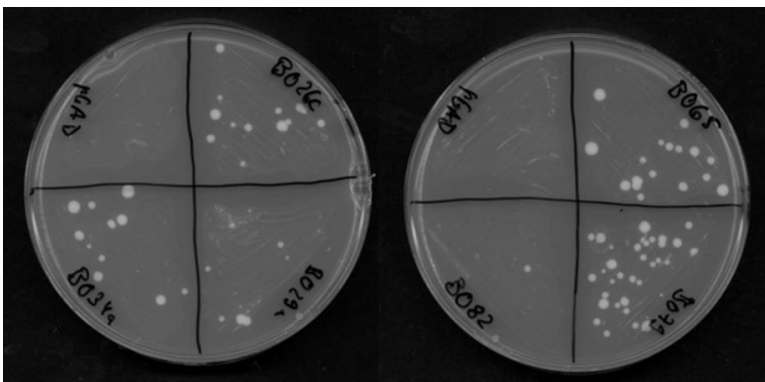


Abbildung 18: LiOAc-Transformation von eIF3i-Klonen

Der linke obere Quadrant zeigt die Negativ-Kontrolle mit pGAD. Bei dem Klon B029_a handelt es sich um den kürzesten isolierten eIF3i-Klon des Screenings mit einer Länge von 74 AS. Die Abbildung zeigt das Wachstum der Hefezellen nach 6 Tagen auf SDC-4AS mit DHT.

5. Transaktivierungsassays

Im Yeast-Two-Hybrid-Screening des Entwicklungsstadiums E16 wurde mehrfach das Protein eIF3i isoliert. In zellulären Androgen-abhängigen Reporteragen-Assays untersuchten wir das Kandidatenprotein auf eine aktivierende oder reprimierende Wirkung. EIF3i wurde in einen Expressionsvektor kloniert und für Transaktivierungsstudien verwendet. Die Plasmide wurden zusammen mit dem AR-Expressionsplasmid pHeIF3i und dem Reportervektor (ARE)₂-TATA in HeLa- und COS-1-Zellen transfiziert. (ARE)₂-TATA enthält ein Luziferase-Gen als Reporter. Oberhalb des Reportergens liegt jeweils eine spezifische Promotorregion, die

durch den AR aktiviert werden kann. Bindet der AR an den Promotor, kommt es zur Transkription der Luziferase. Nach Zugabe eines Substrates kann die entstandene Lichtreaktion im Luminometer gemessen werden. Ein Koaktivator würde in einem Transaktivierungsassay eine Erhöhung des Lichtsignals, ein Korepressor eine Verringerung des Signals bewirken.

In der Abbildung 19 und 20 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit dem $(ARE)_2$ TATA-Promotor in COS-1- und HeLa-Zellen zusammengestellt. Insgesamt wurden 3 unabhängige Versuche in Triplikaten mit dem AR durchgeführt.

Die Reporteraktivität nach DHT-Induktion durch den AR in den jeweiligen Kontrollexperimenten ohne Koregulator (mit leerem Plasmid) wurde als 100 Einheiten Transaktivierung festgesetzt und in die Berechnungen mit einbezogen. Ein Wert von 100 gab an, dass kein Einfluss auf die Transaktivierung festzustellen war. Werte unter 100 zeigten entsprechend eine Repression und Werte über 100 eine Erhöhung der Transaktivierung.

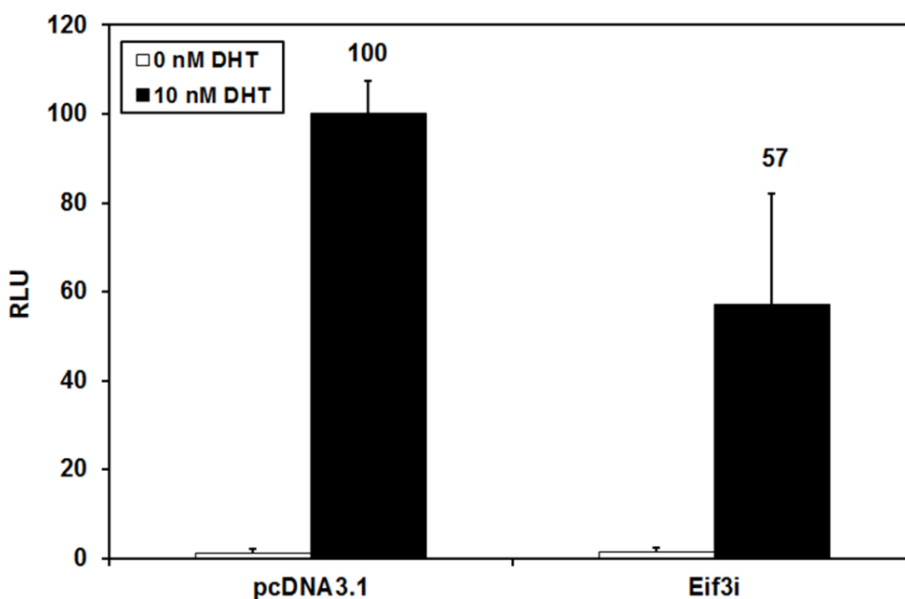


Abbildung 19: Ergebnisse der Versuchsreihe mit dem $(ARE)_2$ TATA-Promotor in COS-1-Zellen.

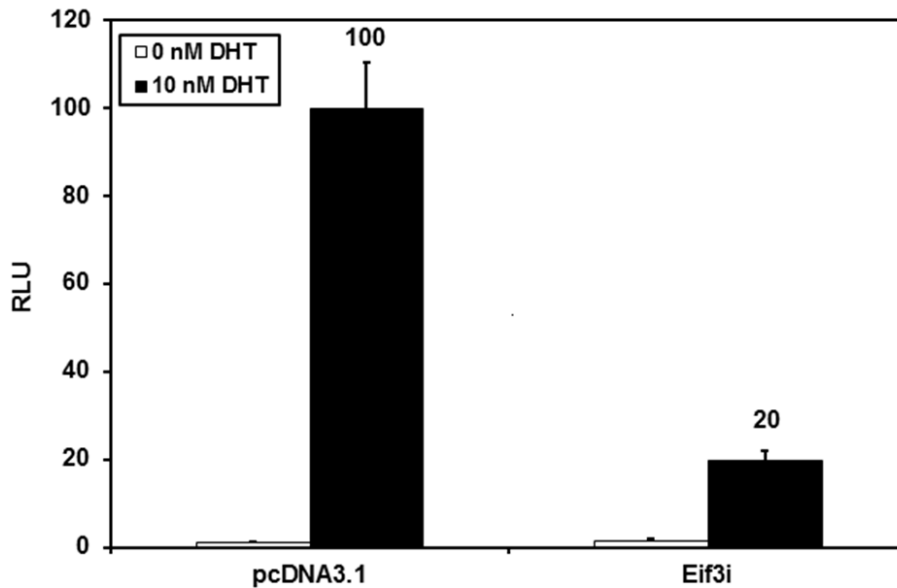


Abbildung 20: Ergebnisse der Versuchsreihe mit dem (ARE)₂TATA-Promotor in HeLa-Zellen.

Abhängig von DHT konnte in beiden Zellreihen eine Erniedrigung der AR-abhängigen Transaktivierung durch eIF3i beobachtet werden, in COS-1-Zellen auf 57%, in HeLa-Zellen sogar auf 20%. Insgesamt geben die Ergebnisse Hinweise darauf, dass eIF3i als Korepressor des ARs wirken könnte.

6. EIF3i-Immunhistochemie

Da wir mehrfach das Protein eIF3i im Yeast-Two-Hybrid-Screening des Entwicklungsstadiums E16 isoliert hatten, wollten wir mittels immunhistologischer Färbung zeigen, dass das Protein im Genitalhöcker der Maus exprimiert wird. Hierfür wurden unter Verwendung des eIF3i-spezifischen Antikörpers anti-eIF3i Genitalhöcker- und Hoden-Querschnitte von männlichen Mausembryonen des Entwicklungsstadiums E16 immunhistologisch angefärbt. Immunpositive Zellen für eIF3i färbten sich braun als Ergebnis der DAB (Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)-kolorimetrischen Reaktion. Abbildung 21 oben zeigt einen Querschnitt des Hodens und der Nebenhoden (Antikörper-Verdünnung 1:1.600) mit deutlicher Färbung des Zytoplasmas. In der Abbildung 21 unten kommt der Genitalhöcker bzw. Penis mit Vorhaut (Präputium) in unterschiedlicher Vergrößerung zur Darstellung (Antikörper-Verdünnung 1:800). Da der Penis gewölbt ist, ist er in der Abbildung zweimalig angeschnitten. Wir konnten zeigen, dass eIF3i im Zytoplasma des Genitalhöckers und dort vermutlich in der Epidermis/im Präputium exprimiert wird (siehe Abbildungen 21).

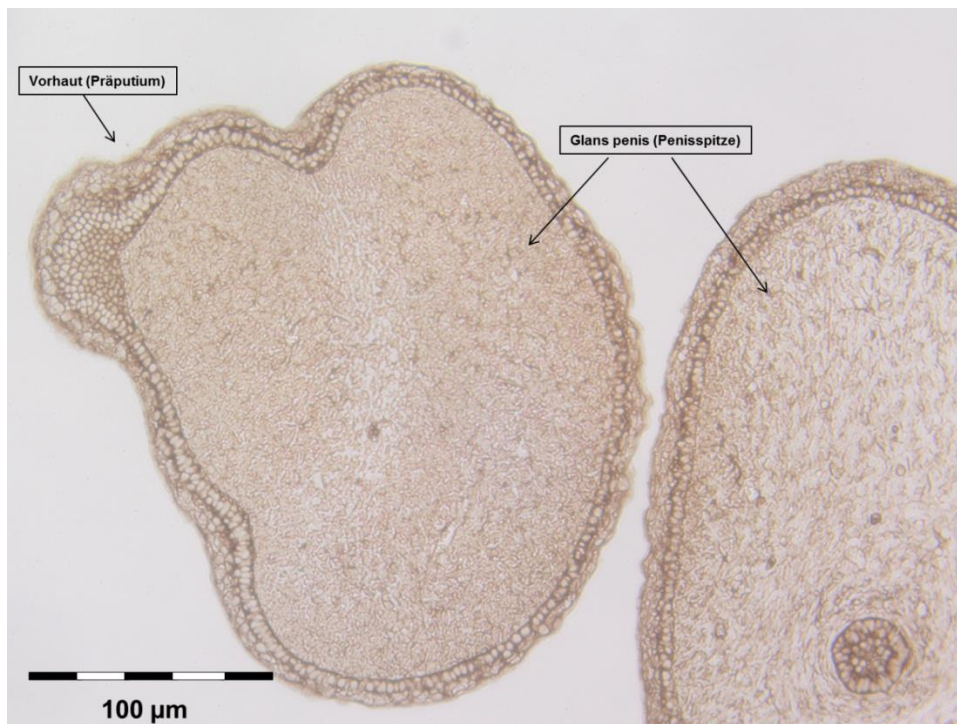
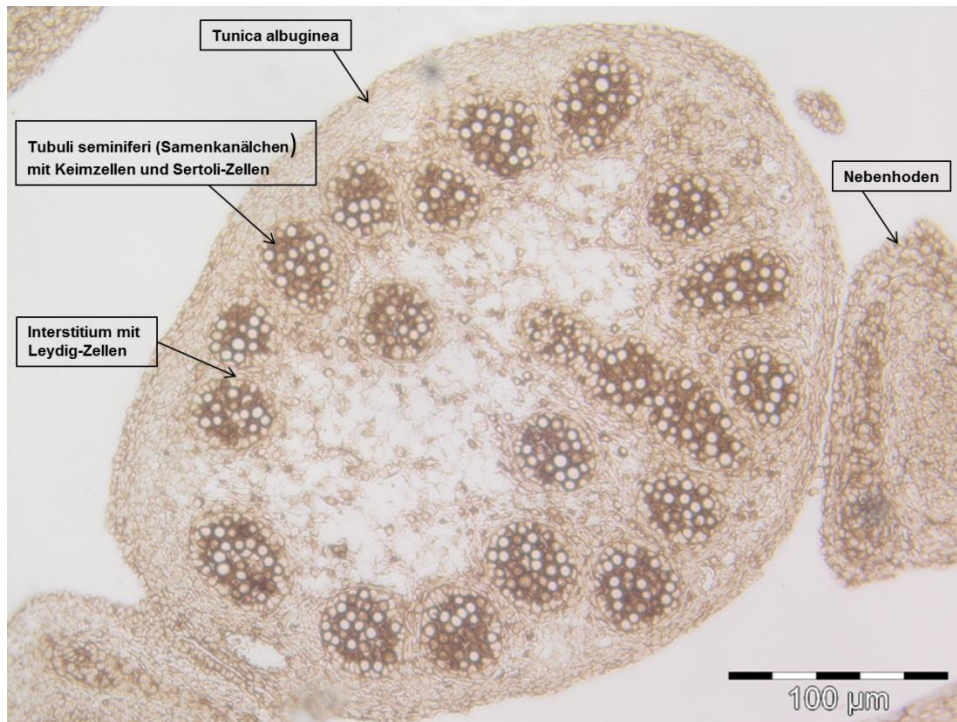


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung mit dem eIF3i-spezifischen Antikörper anti-eIF3i.

Immunopositive Zellen für eIF3i färben sich braun als Ergebnis der DAB (Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)-kolorimetrischen Reaktion. **Oben:** Querschnitt des Hodens und der Nebenhoden mit deutlicher Färbung des Zytoplasmas. Antikörper-Verdünnung 1:1.600. **Unten:** Querschnitt des Genitalhöckers bzw. Penis' mit Vorhaut (Präputium) mit deutlicher Färbung des Zytoplasmas vermutlich im Bereich der Epidermis/des Präputiums. Antikörper-Verdünnung 1:800.

IV Diskussion

Mit Hilfe des Maus-Modells als Tiermodell der embryonalen Entwicklung der äußeren männlichen Geschlechtsmerkmale konnten Koregulatoren des ARs identifiziert werden, die während der Androgen-abhängigen Entwicklung im Genitale des männlichen Mausembryos exprimiert werden. Die mRNA aus Genitalhöckern männlicher Mausembryonen wurde zur Herstellung von cDNA-Bibliotheken verwendet, die mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Systems auf Proteine durchmustert wurden, die Androgen-abhängig mit der LBD des ARs interagierten. Durch mehrfache Retransformationen wurden positive Klone bestätigt und im Anschluss sequenziert. Die Identifizierung der Maus-Proteine geschah über BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Suche in den Nukleotid- und Protein-Datenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden drei unabhängige Yeast-Two-Hybrid-Screenings der Entwicklungsstadien E15, E16 und E17 (Screening A, B und C) durchgeführt. Hierbei konnten insgesamt 16 bekannte Koregulatoren des ARs identifiziert werden. Neun dieser 16 Koregulatoren konnten auch im Screening B (E16) der hier vorliegenden Arbeit isoliert werden (Tabelle 1). Dies zeigte, dass das Yeast-Two-Hybrid-Screening grundsätzlich funktioniert hat. Eine Isolierung bekannter Koregulatoren des ARs war zu erwarten, da viele dieser Proteine ubiquitär exprimiert werden.

Beta-Catenin ist ein bekannter Kofaktor des ARs, den wir in unseren Screenings isoliert haben und dessen Funktion im Genitalhöcker bereits genauer beschrieben wurde. Das Protein und der Wnt/Beta-Catenin-Signalweg spielen schon in der frühen Phase der Ausbildung des Genitalhöckers eine wichtige Rolle, die unabhängig von Androgenen ist (Lin et al., 2008; Miyagawa et al., 2009). Androgen-abhängig interagiert Beta-Catenin mit dem AR, wandert mit diesem in den Kern und kann dort die AR-vermittelte Transkription aktivieren (Pawlowski et al., 2002; Yang et al., 2002). Miyagawa et al. beschrieben, dass Beta-Catenin im mesenchymalen Bereich des männlichen Genitalhöckers, in dem der AR verstärkt exprimiert wird, höher exprimiert ist als im weiblichen Genitalhöcker (Miyagawa et al., 2009 b). Bei diesen Arbeiten wurden Gewebe-spezifische induzierbare Knock-in- und Knock-out-Mäuse verwendet. Eine Heraufregelung von Beta-Catenin in

entsprechenden Regionen des weiblichen Genitalhöckers hatte eine teilweise Virilisierung des Genitales zur Folge. Eine lokal induzierte Herunterregulierung der Expression von Beta-Catenin im männlichen Genitalhöcker führte zu einer verminderten Virilisierung des Genitales. Unbeantwortet ist, ob Beta-Catenin eine Virilisierung des Genitalhöckers durch seine Funktion als AR-Koregulator ausübt oder ob es über die AR-abhängige Transkription heraufreguliert wird und es so zu einer verstärkten Induktion des Wnt/Beta-Catenin-Signalweges im männlichen Genitalhöcker kommt.

Neben Beta-Catenin haben wir die bekannten AR-Koregulatoren AATF (Apoptosis-antagonizing transcription factor)/Rb-binding protein Che-1, AES (Amino-terminal enhancer of split), Alpha-Aktinin-2, Alpha-Aktinin-4, ARA55/Hic-5 (Androgen receptor-associated *protein* 55), Beta-Aktin, Foxo1 (Forkhead box *protein* O1), Gelsolin, Hsp40 (Heat Shock Protein 40), Pias1 (protein inhibitor of activated STAT1), Psmc3 (proteasome 26S subunit, ATPase 3), Rack1 (receptor for activated C-kinase), SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), SRC-3 (steroid receptor coactivator-3) und Ubc9 in unseren Screenings isoliert. Alle diese Proteine sind ubiquitär in der Maus und dem Mausembryo exprimiert [(<http://www.uniprot.org>) und darin enthaltene Datenbanken, (www.eurexpress.org)] und üben neben ihrer regulatorischen Wirkung auf den AR weitere Funktionen in der Zelle aus. AATF/Che-1, Foxo1 und Pias1 können als rein nukleäre Proteine angesehen werden, die nach der Translation im Zytosol über ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) in den Kern gelangen (Page et al., 1999; Zhao et al., 2004). Durch Sequenzanalyse konnten zwei NLS für Pias 1 identifiziert werden (<http://www.uniprot.org/uniprot/O75925>). Diese wurden allerdings bisher nicht experimentell bestätigt. Für AES wurde bisher auch nur eine Lokalisation und Funktion im Kern beschrieben, allerdings besitzt das Protein kein NLS. Die anderen Proteine können wie Beta-Catenin zwischen dem Kern und dem Zytosol hin und her wandern (Aktin, Alpha-Aktinin 4, ARA55, Hsp40, Psmc3, Rack1, SRC-1, SRC-3 und Ubc9) oder sind bisher als rein zytosolische Proteine (Alpha-Aktinin-2 und Gelsolin) beschrieben worden. Für das zytosolische Protein Gelsolin gibt es zwar erste Hinweise auf ein Vorkommen im Zellkern (Nishimura et al., 2003), diese Daten sind bisher allerdings nicht eindeutig und sollten mit Vorsicht betrachtet werden. Dabei ist zu beachten, dass eine Funktion im Kern für

viele zuvor als rein zytosolisch betrachtete Proteine wie z. B. Aktin erst in den letzten Jahren wirklich aufgezeigt werden konnte. Zheng et al. konnten beispielsweise zeigen, dass nukleäres Aktin für die Transkription aller drei RNA-Polymerasen benötigt wird (Zheng et al., 2009). In diesem Bereich wird sicherlich noch mit weiteren interessanten Ergebnissen zu rechnen sein.

Neben den bekannten Koregulatoren haben wir durch unsere Screenings eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die bei der Kontrolle der Transkription und des Zellzyklus sowie bei der Differenzierung und embryonalen Entwicklungsprozessen eine Rolle spielen. Die identifizierten Maus-Proteine und ihre humanen Orthologe wurden auf konservierte AR-Bindungsmotive (FxxLF-, FxxFF-, FxxMF- und LxxLL-Motive) untersucht. Aufgrund der vorhandenen Bindungsmotive, der bestehenden Kenntnisse über die Proteine und einer mehrfachen Isolierung in den Screenings, haben wir aus dem Screening des Entwicklungsstadiums E16 insgesamt 6 Proteine als potentielle Koregulatoren des ARs eingestuft. Hierbei handelt es sich um Baf45a, CapG, Rwdd1, Trip6, Znf12 und eIF3I. Baf45a und Znf12 sind nukleäre Proteine, Trip6 und CapG kommen sowohl im Kern als auch im Zytosol vor und Rwdd1 und eIF3I wurden bisher nur als zytosolische Proteine beschrieben.

Da **Rwdd1** bereits auf eine Funktion als AR-Koaktivator untersucht wurde und diese Daten von unserer Arbeitsgruppe veröffentlicht wurden (Grötsch et al., 2012), wird dieses Protein hier nicht weiter diskutiert.

Bei dem Protein **Baf45a (BRG1-associated factor 45KD a; Phf10=PHD finger protein 10, Ph10)** handelt es sich um eine Untereinheit des SWI/SNF Chromatin-Remodeling-Komplexes. Es beeinflusst ATP-abhängig die Kondensation der Nukleosomen und wirkt so regulierend auf die Transkription (van de Wijngaart et al., 2009). Bislang sind vier Homologe der Baf45-Proteinfamilie (Baf45a, b, c und d) beschrieben worden. Eine Assoziation verschiedener Baf45-Proteine mit dem SWI/SNF-Grundkomplex wirkt unterschiedlich auf die Transkription bestimmter Zielgene. Durch einen Switch der Untereinheiten können komplexe zelluläre Mechanismen reguliert werden. Baf45a wird z.B. für die Proliferation neuronaler Stammzellen benötigt und wird bei der Differenzierung der Neuronen durch Baf45b und c ersetzt (Lessard et al., 2007). Interessanterweise wurden die Kom-

ponenten des SWI/SNF-Komplexes Baf57 und Baf60a bereits als Koregulatoren des ARs beschrieben (Link et al., 2005). Baf57 wird im luminalen Epithel der Prostata exprimiert und wird für die AR-abhängige Transaktivierung in Prostata-Adenokarzinom-Zellen benötigt. Link et al. konnten zeigen, dass ein Verlust von Baf57 die AR-Aktivität reduziert. Die Funktion von Baf57 ist hierbei von der SWI/SNF ATPase-Funktion abhängig. Baf60a interagiert mit dem AR Hormon-abhängig über ein C-terminal gelegenes FxxFF-Motiv (van de Wijngaart et al., 2009). Van de Wijngaart et al. konnten zeigen, dass eine Baf60a-Mutante, bei dem das FxxFF-Motiv zu einem FxxAA mutiert war, nicht mit dem AR interagiert. Baf60a konnte außerdem nicht an den AR binden, wenn die Aminosäure K720 in der Kofaktorbindungsgrube des ARs mutiert war. Da Baf45a allgemein aktivierend auf die Transkription in unseren zellulären Assays wirkte, wurde die Renilla-Kontrolle unserer Transaktivierungsassays leider unbrauchbar und Baf45a wurde von uns zunächst nicht weiter untersucht, obwohl es als möglicher AR-Kofaktor weiter interessant erscheint.

Znf12 (zink finger protein 12, auch KROX7) ist ortholog zum humanen **ZNF325 (zinc finger protein 325)**. ZNF325 ist ein Kernprotein mit 8 Zinkfinger-Domänen des C2H2-Typs und damit homolog zum Transkriptionsfaktor Krüppel aus *Drosophila*. ZNF325 kann reprimierend auf die Transkription wirken. Zhao et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von ZNF325 in COS-7-Zellen die Transkriptionsaktivität von AP-1 und SRE inhibiert. Entsprechend beschrieben sie auch, dass in zellulären Transaktivierungsassays die Herunterregulierung von ZNF325 eine Erhöhung der AP-1- oder SRE-abhängigen Transkription bewirkt (Zhao et al., 2006). Verschiedene Transkriptionsfaktoren können sich durch gegenseitige Bindung beeinflussen. Daher könnte Znf12 kein klassischer AR-Kofaktor sein, sondern durch Bindung des ARs Transrepression an AR-Promotoren bewirken. Weitere Untersuchungen sind zur Aufklärung eines solchen Mechanismus im Genitalhöcker der männlichen Maus notwendig.

Das Protein **CapG (capping protein, gelsolin-like)** gehört zur Familie der Gelsolin-ähnlichen Aktin-Capping-Proteine und kommt konstitutiv im Zytoplasma und im Kern vor. Es ist hochhomolog zum N-Terminus des bekannten AR-Kofaktors Gelsolin. Wie Gelsolin beinhaltet es ein FxxFF-Motiv, wobei bereits für Gelsolin die Wichtigkeit dieses Motivs für die Interaktion mit dem AR beschrieben

wurde (van de Wijngaart, et al., 2006). In Reporter-Assays wirkt CapG reprimierend auf die VP16-abhängige Transkription. Nukleäres CapG, welches durch aktiven Transport in den Kern zu gelangen scheint, ist für die Invasionsfähigkeit von Zellen entscheidend (De Corte et al., 2004). Allerdings wurde bisher nicht gezeigt, ob die Beeinflussung der Invasivität in Zusammenhang mit einer Funktion von CapG als Transkriptionsrepressor steht. Bis heute wurde keine Interaktion von CapG mit einem Kernprotein beschrieben, wodurch die in unserem Screening identifizierte Interaktion mit dem AR besonders interessant erscheint und entsprechende Analysen weitergeführt werden sollten.

Trip6 (thyroid hormone receptor-interacting protein 6) oder ZRP-1 (zyxin-related protein-1) wurde ursprünglich 1995 in einem Yeast-Two-Hybrid-Screening mit dem Thyroid-Rezeptor identifiziert. Es handelt sich um ein Adapterprotein, welches zur Zyxin-Familie der LIM-Proteine gehört (Diefenbacher et al., 2008; 2010; Lin et al., 2008). Trip6 verfügt über ein nukleäres Exportsignal (NES) innerhalb der NTD und hat drei LIM-Domänen am C-terminalen Ende. Primär existiert es im Zytoplasma, reguliert in fokalen Adhäsionskontakten die Migration und steht dort mit dem Zytoskelett in Verbindung. Trip6 rekrutiert im Zytosol eine Vielzahl von Signalmolekülen und ist dadurch in diverse zelluläre Antworten involviert wie die Aktin-zytoskelettale Reorganisation, Zelladhäsion und -migration oder Apoptose. Trip6 ist aber auch in der Lage, im Kern als Koregulator der Transkription zu fungieren. Die N-terminal verkürzte Variante (nTrip6) wurde als selektiver Koaktivator von Fos-beinhaltenen AP1-Dimeren beschrieben. Es interagiert zum Einen mit c-Fos über seine C-terminalen LIM-Domänen, zum anderen aber auch mit NF- κ B und AP-1 an GR-gebundenen Promotoren, was zur Transrepression durch den GR führt (Diefenbacher et al., 2008; 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es interessant zu untersuchen, ob eine AR-bindende Eigenschaft für nTrip6 und Trip6 aufgezeigt werden kann und ob die jeweilige Interaktion im Zytosol oder im Zellkern stattfindet. Weitere Untersuchungen sollten hierzu folgen.

Das Protein **eIF3i (Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1; auch TIF32, TRIP-1, eIF3p36, eIF3S2, eIF3-beta)** wurde insgesamt 15 Mal mit unterschiedlicher Länge isoliert, so dass in der vorliegenden Arbeit vorwiegend mit diesem Protein weitergearbeitet wurde. In zellulären Androgen-abhängigen

Reporter-gen-Assays in HeLa- und COS-1-Zellen konnte gezeigt werden, dass eIF3i eine reprimierende Wirkung auf die AR-Transaktivierung hat (siehe Abbildung 19-20). In COS-1-Zellen war die AR-Transaktivierung auf 57%, in HeLa-Zellen sogar auf 20% reduziert. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass eIF3i als Korepressor des ARs wirken könnte. Unterschiedliche Ergebnisse in den verschiedenen Zelllinien waren bei diesen Untersuchungen zu erwarten. Dies kann unter anderem durch eine unterschiedliche Expression von Koregulatoren in den verschiedenen Zelllinien begründet werden.

Mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung von Genitalhöcker-Querschnitten männlicher Mausembryonen des Entwicklungsstadiums E16 mit einem eIF3i-spezifischem Antikörper sollte die Expression und Lokalisation des Proteins im Genitalhöcker der Maus analysiert werden. Hierbei zeigte sich, dass eIF3i im Zytoplasma des Genitalhöckers und dort vermutlich in der Epidermis/im Präputium zu finden ist.

Das eIF3i-Protein besteht aus insgesamt 325 AS. Die längste im durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Screening von E16 isolierte Sequenz beinhaltet 190 AS (ab AS 135 bis Stop), die kürzeste isolierte Sequenz 74 AS (ab AS 251 bis Stop). Zwischen AS 120 und 126 enthält das Protein ein FxxFF-Motiv, welches jedoch hier im Screening nicht zur AR-Bindung beigetragen haben kann, da alle isolierten Sequenzen erst nach dem FxxFF-Motiv beginnen. Das intrazelluläre Protein eIF3i wird ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert (Human protein atlas, <http://www.proteinatlas.org>) insbesondere im Gewebe des Gehirns, der Lunge, der Leber, des gastrointestinalen Traktes und der weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane. EIF3i ist grundsätzlich dort zytoplasmatisch lokalisiert. Aufgrund seiner geringen Größe (36,5 kDa) würde man allerdings auch erwarten, dass eIF3i durch die Kernporen in den Kern diffundieren kann. EIF3i wurde initial als WD40 repeat-containing Protein identifiziert, welches vom TGF- β Typ Rezeptor II gebunden und phosphoryliert wird und den TGF- β -Signalweg moduliert (Choy & Derynck, 1998). So wurde es zunächst als TRIP-1 (TFG- β receptor II interacting protein-1) bezeichnet. Bei TGF- β handelt es sich um einen potenten Wachstumshemmer vieler unterschiedlicher Gewebetypen und es induziert eine Vielzahl extrazellulärer Matrixproteine und Adhäsions-Rezeptoren. Nach Bindung des Liganden an den TGF- β -Rezeptor kommt es zur Rekrutierung,

Phosphorylierung und gleichzeitig zur Aktivierung des Typ I TGF- β -Rezeptors. Der aktivierte Typ I TGF- β -Rezeptor phosphoryliert Smad2 oder Smad3, welches sich dann vom Rezeptor löst und einen Komplex mit Smad4 formiert. Dieser Komplex wandert in den Zellkern und interagiert dort mit Transkriptionsfaktoren und reguliert die Genexpression. Choy und Derynck konnten zeigen, dass eine vermehrte Expression von eIF3i die TGF- β -induzierte Genexpression des PAI-1-Promoters inhibiert, dass das Protein aber kaum einen Effekt auf die TGF- β -induzierte Wachstumshemmung hat (Choy & Derynck, 1998). Später wurde das Protein als Teil des eIF3 (eukaryotic initiation factor 3)-Komplexes identifiziert und eIF3i genannt. Die eukaryote Proteinsynthese benötigt die Beteiligung von Translations-Initiationsfaktoren, die an die 40s-Ribosomen-Untereinheit binden und mit anderen eIFs und der mRNA interagieren und so die Generierung des 43 S-Präinitiationskomplexes stimulieren. EIF3 ist mit 550-700 kDa der größte der eIF-Komplexe und besteht aus 10-13 Untereinheiten (eIF3a-eIF3m). Die Arbeitsgruppe um Masutani rekonstruierte einen Initiationsfaktoren-Komplex bestehend aus 11 Untereinheiten. Sie zeigten, dass in vitro die Untereinheiten eIF3g und eIF3i nicht essentiell für die Aktivität des eIF3-Komplexes waren (Masutani et al., 2007). Ahlemann et al. zeigten, dass eine Überexpression von eIF3i in Maus-Fibroblasten zu einer vermehrten Zellproliferation, einer beschleunigten Zellzyklus-Progression und zur Zunahme der Zellgröße führte (Ahlemann et al., 2006). Diese Beobachtungen könnte man durch eine aktivierende Funktion von eIF3i bei der Translation erklären, welche allerdings eine weitere Funktion bei der Transkription nicht ausschließt.

Die Arbeitsgruppe um Qi konnte zeigen, dass eIF3i in humanen Colon-Adenokarzinomen und Adenom-Polypen vermehrt exprimiert wird (Qi et al., 2014). Eine Überexpression von ektopem eIF3i in intestinalen Epithelzellen führte zur Onkogenese und zu einer vermehrten Expression von Beta-Catenin in den Zellen. EIF3i erhöhte die Synthese von COX-2, einer Prostaglandinsynthase. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass durch die vermehrte Synthese von Prostaglandin E2 (PGE₂) ein bekannter Signalweg für die Aktivierung und Stabilisierung von Beta-Catenin in Tumorzellen ausgelöst werden konnte. Der Beta-Catenin/TCF4-Signalweg vermittelt also eine onkogene Funktion von eIF3i.

Die Arbeitsgruppe um Yuan konnte eine weitere onkogene Funktion von eIF3i beschreiben, indem sie zeigten, dass eIF3i für die VEGFA (Vascular endothelial growth factor A)-Expression notwendig ist (Yuan et al., 2014). Bei VEGFA handelt es sich um einen Pro-Angiogenese-Faktor in der Tumor-Angiogenese, der unter Hypoxie vermehrt in Tumorzellen gebildet wird. Ein eIF3i-Zebrabärbling-Mutant zeigte ausgeprägte Defekte der Angiogenese und in humanen Leberzell-tumorzellen bewirkte eine Depletion von eIF3i eine verminderte Angiogenese in Tumormodellen. Zusammenfassend ist das mehrfach im Screening isolierte Protein eIF3i in die Zellproliferation, Zellzyklus-Progression und Tumor-Angiogenese involviert und stellt möglicherweise in Zukunft einen therapeutischen Angriffspunkt bei der Behandlung von verschiedenen humanen Tumorarten dar.

Im Genitalhöcker ist eIF3i bisher nicht beschrieben worden. Dass wir das Gen sehr oft aus unseren cDNA-Bibliotheken isoliert haben, könnte auf eine erhöhte Expression von eIF3i hinweisen. Diese ließe sich auch durch eine starke Translationsaktivität im sich schnell teilenden embryonalen Gewebe und eine erhöhte Menge des eIF3-Translationskomplexes erklären. Es wäre aber auch möglich, dass eIF3i eine andere Funktion im Genitalhöcker ausübt. Falls eIF3i wirklich als AR-Repressor wirkt, worauf unsere zellulären Assays hindeuten, könnte es vielleicht Androgen-abhängig die Transkription eines Genproduktes hemmen, welches normalerweise die Proliferation hemmt und so auch indirekt eine erhöhte Proliferation von Zellen bewirken.

Wie andere bereits als AR-Koregulatoren beschriebene Proteine, beinhalten CapG und eIF3i ein Phenylalanin-reiches Bindungsmotiv, genauer gesagt ein FxxFF-Motiv. Über solch ein Bindungsmotiv ist Androgen-abhängig eine Interaktion mit der AF2 der AR-LBD möglich (He et al., 2002). Im Vergleich zu anderen nukleären Rezeptoren, die mit LxxLL-Motiven interagieren, präferiert der AR eine Interaktion mit FxxLF-Motiven (He et al. 2002; 2004; Hur et al., 2004; Dubbink et al., 2004; 2006; van de Wijngaart et al., 2006). Diese besondere Eigenschaft des ARs, die FxxLF-Motive stärker als die LxxLL-Motive zu binden, erklärt sich zum einen aus der Konformation der AF2 an sich, da die tiefe AF2-Bindungsgrube die Aufnahme großer Phenylalanin-Seitenketten ermöglicht. Zum anderen wird die Interaktion zusätzlich durch flankierende Aminosäuren, die elektrostatische Wechselwirkungen mit dem FxxLF-Motiv ausbilden, unterstützt (Claessens et al. 2008;

Dubbink et al., 2004). Für die Interaktion mit dem FxxLF-Motiv sind vor allem F an Position 1 und 5 für eine starke Interaktion der AR-LBD von Bedeutung und werden gegenüber L-Residuen favorisiert (Dubbink, et al., 2006). Das FxxFF-Motiv von CapG befindet sich am extremen C-Terminus des Proteins von Mensch und Maus innerhalb unseres Klons. Das FxxFF-Motiv von eIF3i befindet sich an Position 121 bis 125 der Aminosäure-Sequenz und damit außerhalb unserer isolierten Klone. Ob es für die Interaktion mit dem AR eine Rolle spielt, können wir daher bisher nicht beantworten. Hierzu wären weitere Untersuchungen wie z. B. AR-Transaktivierungsassays mit eIF3i und einer eIF3i-Mutante (mit mutiertem Bindungsmotiv) im Vergleich notwendig. Bisher lässt sich nur feststellen, dass das Motiv im eIF3i-Protein der Maus und des Menschen konserviert ist.

Anzumerken ist, dass ein grundsätzliches Problem der Yeast-Two-Hybrid-Methode ist, dass auch falsch-positive Klone selektiert werden können. Eine Ursache hierfür ist beispielsweise, dass bei dem Yeast-Two-Hybrid-System alle Bait- und Prey-Proteine durch Lokalisationssignale in den Kern transportiert werden, wo viele der Proteine natürlicherweise nicht vorkommen. Ein positives Ergebnis in einem Yeast-Two-Hybrid-System kann daher nur als Hinweis auf eine Protein-Interaktion bewertet werden. Für den zweifelslosen Nachweis einer Interaktion zweier Proteine sind direktere, biochemische Methoden notwendig. Daher planen wir Methoden wie GST-Pulldowns und Immunpräzipitationen zu verwenden, um die Interaktion von eIF3i mit dem AR zu verifizieren. Auch die Interaktion des ARs mit den anderen neuen Interaktionspartnern aus den Yeast-Two-Hybrid-Screenings soll weiter analysiert werden.

V Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Koregulatoren des Androgenrezeptors (ARs) identifiziert, die während der Androgen-abhängigen Entwicklung im Genital des Mausembryos eine spezifische Rolle für die Virilisierung des männlichen Genitales spielen könnten. Hierzu wurde die mRNA aus Genitalhöckern männlicher Mausembryonen des Entwicklungsstadiums E16 extrahiert. Mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Systems wurden putative AR-Koregulatoren isoliert, die Androgen-abhängig mit der Liganden-bindenden Domäne des ARs interagierten.

Neben einer Reihe bekannter Koregulatoren des ARs wie Aktin, Aktinin- α 2, ARA55, Beta-Catenin, Gelsolin, Hsp40 oder Rack1 konnten im Screening des Entwicklungsstadiums E16 insgesamt 6 weitere Proteine isoliert werden, die aufgrund vorhandener AR-Bindungsmotive, bestehender Kenntnisse über die Proteine und einer mehrfachen Isolierung in den Screenings als mögliche Koregulatoren des ARs eingestuft wurden. Bei den 6 Proteinen handelt es sich um Baf45a, CapG, Rwd1, Trip6, Znf12 und eIF3i.

eIF3i (Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1) wurde in diesem Screening insgesamt 15 Mal mit unterschiedlicher Länge isoliert, so dass in dieser Arbeit besonders mit diesem Protein weitergearbeitet wurde. In zellulären Androgen-abhängigen Reporter-Gen-Assays in HeLa- und COS-1-Zellen konnte gezeigt werden, dass eIF3i eine reprimierende Wirkung auf die AR-Transaktivierung hat und somit möglicherweise als Korepressor des ARs wirken könnte. Mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung von E16 Genitalhöcker-Querschnitten männlicher Mausembryonen mit einem eIF3i-spezifischem Antikörper konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Protein im Zytoplasma der Epidermis/des Präputiums exprimiert wird.

Die hier identifizierten und als interessant eingestuften AR-Koregulatoren könnten neue Gene der Genitalentwicklung darstellen, deren Fehlfunktionen möglicherweise auch zu Störungen/Besonderheiten der Genitalentwicklung im Menschen führen. Eine genaue Analyse der Wirkungsweise dieser Koregulatoren ist notwendig. Dadurch könnten in Zukunft vielleicht neue Therapieansätze beim PAIS oder beim Prostata-Karzinom gefunden werden.

VI Literaturverzeichnis

- Adachi, H., Kume, A., Li, M., Nakagomi, Y., Niwa, H., Do, J., et al. (2001). Transgenic mice with an expanded CAG repeat controlled by the human AR promoter show polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction without neuronal cell death. *Human Molecular Genetics* 10(10), S. 1039-1048.
- Adachi, M., Takaynagi, R., & Tomura, A. (September 2000). Androgen-Insensitivity Syndrome As A Possible Coactivator Disease. *The New England Journal of Medicine*, S. 856-863.
- Agoulnik, I., Vaid, A., Nakka, M., Alvarado, M., Bingman III, W., Erdem, H., et al. (November 2006). Androgen Modulate Expression of Transkription Intermediary Factor 2, an Androgen Receptor Coactivator whose Expression Level correlates with Early Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. *Endocrinology*.
- Ahlemann, M., Zeidler, R., Lang, S., Mack, B., Münz, M., & Gires, O. (Mai 2006). Carcinoma-Associated eIF3i Overexpression Facilitates mTOR-dependent Growth Transformation. *Molecular Carcinogenesis* 45, S. 957-967.
- Alarid, Cunha, Young, & Nicoll. (Oktober 1991). Evidence for an organ- and sex-specific role of basic fibroblast growth factor in the development of the fetal mammalian reproductive tract. *Endocrinology*, S. 2148-2154.
- Archer, S. K., Claudianos, C., & Campbell, H. D. (2005). Evolution of the gelsolin family of actin-binding proteins as novel transcriptional coactivators. *Bio Essays* 27.4, S. 388-396.
- Askew, E., Gampe, R., Stanley, T., Faggart, J., & Wilson, E. (August 2007). Modulation of Androgen Receptor Activation Function 2 by Testosterone and Dihydrotestosterone. *The Journal of Biological Chemistry* 282,35, S. 25801-25816.
- Aumüller, G., Holterhus, P.-M., Konrad, L., von Rahden, B., Hiort, O., Esquenet, M., et al. (1998). Immunohistochemistry and in situ hybridization of the androgen receptor in the developing human prostate. *Anat Embryol* 197, S. 199-208.
- Baskin, L., Liu, W., Bastacky, J., & Yucel, S. (2004). Anatomical Studies of the Mouse Genital Tubercle. In L. S. Baskin, *Hypospadias and Genital Development* (S. 103-121). Kluwer Academic/Plenum Publishers.

- Bebermeier, J. H., Brooks, J. D., DePrimo, S. E., Werner, R., Deppe, U., Demeter, J., et al. (März 2006). Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription. *J Mol Med*.
- Beleza-Meireles, A., Barbaro, M., Wedell, A., Töhönen, V., & Nordenskjöld, A. (März 2007). Studies of a co-chaperone of the androgen receptor, FKBP52, as candidate for hypospadias. *Reproductive Biology and Endocrinology* 5:8.
- Brinkmann, A., Faber, P., van Rooij, H., Kuiper, G., Ris, C., Klaassen, P., et al. (1989). The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem* 34, S. 307-310.
- Bulyanko, Y. A., & O'Malley, B. W. (2010). Nuclear Receptor Coactivators: Structural and Functional Biochemistry. *Biochemistry* 50, S. 313-328.
- Cano, L. Q., Lavery, D., & Bevan, C. (Januar 2013). Mini-review: Foldosome regulation of androgen receptor action in prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, S. 52-62.
- Carré, G.-A., & Greenfield, A. (März 2014). Characterising Novel Pathways in Testis Determination Using Mouse Genetics. *Sexual Development* 8, S. 199-207.
- Centenera, M., Harris, J., Tilley, W., & Butler, L. (Juli 2008). The Contribution of Different Androgen Receptor Domains to Receptor Dimerization and Signaling. *Molecular Endocrinology* 22(11), S. 2373-2382.
- Chen, H., Yong, W., jr, H. T., Yang, Z., Zhou, Y., Sanchez, E., et al. (September 2010). Fkbp52 regulates androgen receptor transactivation activity and male urethra morphogenesis. *J Biol Chem* 285(36), S. 27776-27784.
- Cheng, J., Wang, D., Wang, Z., & Yeh, E. (Juli 2004). SENP1 Enhances Androgen Receptor-Dependent Transcription through Desumoylation of Histone Deacetylase 1. *Molecular and Cellular Biology* 24(13), S. 6021-6028.
- Choy, L., & Derynck, R. (Mai 1998). The Type II Transforming Growth Factor (TGF)- β Receptor-interacting Protein TRIP-1 Acts as a Modulator of the TGF- β Response. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (47), S. 31455-31462.
- Claessens, F., Denayer, S., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C., & Haelens, A. (2008). Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nuclear Recept Signal* 6: e008.

- Clark, R., Antonello, J., Grossman, S., Wise, L., A. C., Bagdon, W., et al. (Juli 1990). External genitalia abnormalities in male rats exposed in utero to finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor. *Teratology* 42(1), S. 91-100.
- Coutant, R., Mallet, D., Lahlou, N., Bouhours-Nouet, N., Guichet, A., Coupri, L., et al. (2007). Heterozygous Mutation of Steroidogenic Factor-1 in 46,XY Subjects May Mimic Partial Androgen Insensitivity Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 (8), S. 2868-2873.
- Cutress, M., Whitaker, H., Mills, I., Stewart, M., & Neal, D. (Januar 2008). Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *Journal of Cell Science* 121, S. 957-968.
- Dasgupta, S., Lonard, D., & O'Malley, B. (2014). Receptor Coactivators: Master Regulators of Human Health and Disease. *Annual Reviews Med* 65, S. 279-292.
- Dasgupta, S., Putluri, N., Long, W., Zhang, B., Wang, J. K., Arnold, J., et al. (2. März 2015, 125 (3)). Coactivator SRC-2-dependent metabolic reprogramming mediates prostate cancer survival and metastasis. *J Clin Invest.*, S. 1174-1188.
- De Corte, V., Van Impe, K., Bruyneel, E., Boucherie, C., Mareel, M., Vandekerckhove, J., et al. (Juli 2004). Increased importin- β -dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion. *Journal of Cell Science* 117, S. 5283-5292.
- Deeb, A., Mason, C., Lee, Y. S., & Hughes, I. A. (2005). Correlation between genotype, phenotype and sex of rearing in 111 patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Clinical Endocrinology* 63, S. 56-62.
- Deslypere, J.-P., Young, M., Wilson, J., & McPhaul, M. (1992). Testosterone and 5alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* 88, S. 15-22.
- Diefenbacher, M., Litfin, M., Herrlich, P., & Kassel, O. (2010). The nuclear isoform of the LIM domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at the promoter-bound glucocorticoid-receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 320, S. 58-66.
- Diefenbacher, M., Sekula, S., Heilbrock, C., Maier, J., Litfin, M., von Dam, H., et al. (August 2008). Restriction to Fos Family Members of Trip6-Dependent

- Coactivation and Glucocorticoid Receptor-Dependent Trans-Repression of Activator Protein-1. *Mol Endocrinol.* 22(8), S. 1767-1780.
- Dietrich, & Holzgreve, J. (2007). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer-Verlag.
- Doerks, T., Copley, R., Schulz, J., Ponting, C., & Bork, P. (2002). Systematic Identification of Novel Protein Domain Families Associated with Nuclear Functions. *Genome Research* 12, S. 47-56.
- Dr. med. Richter-Kuhlmann, E. (2015). Junge, Mädchen oder "anderes". *Deutsches Ärzteblatt, Heft 13*, S. 482-483.
- Dubbink, H. J., Hersmus, R., Pike, A., Molier, M., Brinkmann, A., Jenster, G., et al. (Juli 2006). Androgen Receptor Ligand-Binding-Domain Interaction and Nuclear Receptor Specificity of FXXLF and LXXLL Motifs as Determined by L/F-Swapping. *Molecular Endocrinology* 20(8), S. 1742-1755.
- Dubbink, H. J., Hersmus, R., Verma, C., Van der Korput, H., Berrevoets, C. A., Van Tol, J., et al. (2004). Distinct Recognition Modes of FXXLF and LXXLL Motifs by the Androgen Receptor. *Molecular Endocrinology* 18(9), S. 2132-2150.
- Eggers, S., & Sinclair, A. (2012). Mammalian sex determination-insights from human and mice. *Chromosome Res* 20, S. 215-238.
- Fan, C.-Y., Ren, H.-Y., Lee, P., Caplan, A., & Cyr, D. (Januar 2005). The Type I Hsp40 Zinc Finger-like Region Is Required for Hsp70 to Capture Non-native Polypeptides from Ydj1. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (1), S. 695-702.
- Faus, H., Meyer, H., Huber, M., Bahr, I., & Haendler, B. (Dezember 2005). The ubiquitin-specific protease USP10 modulates androgen receptor function. *Mol Cell Endocrinol.* 2045(1-2), S. 138-146.
- Fekete, E. (1938). Sexual abnormalities in an inbred strain of mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 38, S. 59-62.
- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 245-246.
- Fujimoto, N., Miyamoto, H., Mizokami, A., Herada, S., Nomura, M., Ueta, Y., et al. (Februar 2007). Prostate cancer cells increase androgen sensitivity by increase in nuclear androgen receptor and androgen receptor coactivators; a possible mechanism of hormone-resistance of prostate cancer cells. *Cancer Invest.* 25(1), S. 32-37.

- Fujimoto, N., Yeh, S., Kang, H., Inui, S., Chang, H., Mizokami, A., et al. (1999). Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate. *J Biol Chem* 274, S. 8316-8321.
- Geiss-Friedländer, R., & Melchior, F. (Dezember 2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 8, S. 947-955.
- Glass, C., & Rosenfeld, M. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & Development* 14, S. 121-141.
- Gluzman, Y. (Januar 1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 23(1), S. 175-182.
- Gottlieb, B., Lombroso, R., Beitel, L. K., & Trifiro, M. A. (2004). Molecular pathology of the androgen receptor in male (in)fertility. *Reproductive BioMedicine Online Vol. 10*.
- Grötsch, H., Kunert, M., Mooslehner, K. A., Gao, Z., Struve, D., Hughes, I. A., et al. (Juli 2012). RWDD1 interacts with the ligand binding domain of the androgen receptor and acts as coactivator of androgen-dependent transactivation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 6; 358 (1), S. 53-62.
- Guo, Z., Dai, B., Jiang, T., Xu, K., Xie, Y., Kim, O., et al. (Oktober 2006). Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell* 10, S. 309-319.
- Hannema, & Hughes. (2006). Regulation of Wolffian Duct Development. *Hormone Research*, 142-151.
- Hannema, S., Print, C., Charnock-Jones, D., Coleman, N., & Hughes, I. (2006). Changes in Gene Expression during Wolffian Duct Development. *Hormone Research*, 200-209.
- Harada, M., Omori, A., Nakahara, C., Nakagata, N., Akita, K., & Yamada, G. (2015). Tissue-Specific Roles of FGF-Signaling in External Genital Development. *Developmental Dynamics* 244, S. 759-773.
- Haraguchi, Suzuki, & Murakami. (2000). Molecular analysis of external genitalia formation: the role of fibroblast growth factor (Fgf) genes during genital tubercle formation. *Development* 127, S. 2471-79.
- Haragushi, R., Mo, R., Hui, C., Motoyama, J., Makino, S., Shiroishi, T., et al. (2001). Unique functions of Sonic hedgehog signaling during external genitalia development. *Development* 128, S. 4241-4250.

- Haragushi, R., Suzuki, K., Murakami, R., Sakai, M., Kamikawa, M., Kengaku, M., et al. (2000). Molecular analysis of external genitalia formation: the role of fibroblast growth factor (Fgf) genes during genital tubercle formation. *Development* 127, S. 2471-2479.
- He, B., Gampe, R., Kole, A., Hnat, A., Stanley, T., An, G., et al. (November 2004). Structural Basis for Androgen Receptor Interdomain and Coactivator Interactions Suggests a Transition in Nuclear Receptor Activation Function Dominance. *Molecular Cell* Vol. 16, S. 425-438.
- He, B., Mingos, J., Lee, L., & Wilson, E. (März 2002). The FXXLF Motif mediates Androgen Receptor-specific Interactions with Coregulators. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (12), S. 10226-10235.
- Heemers, H., & Tindall, D. (2007). Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex. *Endocrine Reviews*, 778-808.
- Heery, D., Kalkhoven, E., Hoare, S., & Parker, M. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 733-736.
- Heyns, C., & Pape, V. (Januar 1991). Presence of a low capacity androgen receptor in the gubernaculum of the pig fetus. *The Journal of Urology* 145 (1), S. 161-167.
- Heyns, C., Tate, R., Sargent, N., Habib, F., & Chisholm, G. (August 1993). Absence of 5 alpha-reductase activity in the gubernaculum during descent of the fetal pig testis. *The Journal of Urology* 150, S. 510-513.
- Holter, E., Kotaja, N., Mäkela, S., Strauss, L., Kietz, S., Jänne, O., et al. (2002). Inhibition of Androgen Receptor (AR) Function by the Reproductive Orphan Receptor DAX-1. *Molecular Endocrinology* 16(3), S. 515-528.
- Holterhus, P., Salzburg, J., Werner, R., & Hiort, O. (2005). Transactivation Properties of Wild-Type and Mutant Androgen Receptors in Transiently Transfected Primary Human Fibroblasts. *Hormone Research* 63, S. 152-158.
- Holterhus, P.-M., Sinnecker, G., & Hiort, O. (2000). Phenotypic Diversity and Testosterone-Induced Normalization of Mutant L712F Androgen Receptor Function in a Kindred with Androgen Insensitivity. *The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85.

- Hornig, N., de Beaufort, C., Denzer, F., Cools, M., Wabitsch, M., Ukat, M., et al. (April 2016). A Recurrent Germline Mutation in the 5'UTR of the Androgen Receptor Causes Complete Androgen Insensitivity by Activating Aberrant uORF Translation. *PLOS ONE*, S. 1-15.
- Hornig, N., Ukat, M., Schweikert, H., Hiort, O., Werner, R., Drop, S., et al. (September 2016). Identification of an AR-mutation negative class of androgen insensitivity BY DETERMINING endogenous AR-ACTIVITY. *J Clin Endocrinol Metab.*
- Huang, S., Huang, C., Wang, W., Kang, J., & Hsu, W. (2004). The enhancement of nuclear receptor transcriptional activation by a mouse actin-binding protein, alpha actinin 2. *Journal of Molecular Endocrinology* 32, S. 481-496.
- Hughes, I., & Acerini, C. (2008). Factors controlling testis descent. *European Journal of Endocrinology* 159, S. 75-82.
- Hughes, I., Houk, C., Ahmed, S., & Lee, P. (März 2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child*, S. 554-563.
- Hur, E., Pfaff, S. J., Payne, E., Gron, H., Buehrer, B., & Fletterick, R. (September 2004). Recognition and Accomodation at the Androgen Receptor Coactivator Binding Interface. *PLoS Biology* 2 (9), S. 1303-1312.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation fo Escherichia coli with plasmids. *GENE*, 96, S. 23-28.
- Ipulan, L. A., Suzuki, K., Matsushita, S., Suzuki, H., Okazawa, M., Jocinto, S., et al. (Februar 2014). Development of the External Genitalia and Their Sexual Dimorphic Regulation in Mice. *Sexual Development*, S. 297-310.
- Jääskeläinen, J. (April 2012). Molecular biology of androgen insensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 352(1), S. 4-12.
- Jenster, G., van der Korput, H., Trapman, J., & Brinkmann, A. (1995). Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem*, 7341-7346.
- Kahali, B., Yu, J., Marquez, S., Thompson, K., Liang, S., Lu, L., et al. (18. März 2014). The silencing of the SWI/SNF subunit and anticancer gene BRM in Rhabdoid tumors. *Oncotarget*, Vol. 8, No. 10, S. 3314-3332.
- Klokk, T., Kurys, P., Elbi, C., Nagaich, A., Hendarwanto, A., Slagsvold, T., et al. (März 2007). Ligand-Specific Dynamics of the Androgen Receptor at its

- Response Element in Living Cells. *Molecular and cellular Biology*, S. 1823-1843.
- Koletzko. (2013). *Kinder- und Jugendmedizin*. Berlin: Springer-Verlag.
- Kraus, S., Gioeli, D., Vomastek, T., Gordon, V., & Weber, M. (November 2006). Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) and Scr Regulate the Tyrosine Phosphorylation and Function of the Androgen Receptor. *Cancer Research* 66(22), S. 11047-11054.
- Kuhlenbäumer, G., & Bocchichio. (1998). Die X-chromosomal rezessive spinobulbäre Muskelatrophie (Typ Kennedy). *Nervenarzt* 69, S. 660-665.
- La Spada, A. R., Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A., & Fischbeck, K. H. (Juli 1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352, S. 77-79.
- Lahusen, T., Henke, R., Kagan, B., Wellstein, A., & Riegel, A. (Juli 2009). The role and regulation of the nuclear receptor co-activator AIB1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 116 (2), S. 225-237.
- Lavery, D., & McEwan, I. (2006). The human androgen receptor AF1 transactivation domain: interactions with transcription factor IIF and molten-globule-like structural characteristics. *Biochem Soc Trans*, 1054-1057.
- Lee, D. K., & Chang, C. (2003). Endocrine mechanisms of disease; Expression and Degradation of Androgen Receptor: Mechanism and Clinical Implication. *The Journal of Endocrinology & Metabolism* 88 (9), S. 4043-4054.
- Lessard, J., Wu, J., Ranish, J., Wan, M., Winslow, M., Staahl, B., et al. (Juli 2007). An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron*. 19;55, S. 201-215.
- Li, B., Guo, K., Li, C., Li, H., Zhao, P., Chen, K., et al. (Dezember 2015). Influence of suppression of CapG gene expression by siRNA on the growth and metastasis of human prostate cancer cells. *Genet. Mol. Res.* 14 (4), S. 15769-15778.
- Lin, C., Yin, Y., Long, F., & Ma, L. (2008). Tissue-specific Requirements of β -Catenin in External Genitalia. *Development* 135 (16), S. 2815-2825.
- Lin, V., & Lin, F.-T. (November 2011). TRIP6: An Adaptor Protein that Regulates Cell Motility, Antiapoptotic Signaling and Transcriptional Activity. *Cell Signal* 23 (11), S. 1691-1697.

- Link, K. A., Burd, C., Williams, E., Marshall, T., Rosson, G., Henry, E., et al. (2005). BAF57 Governs Androgen Receptor Action and Androgen-Dependent Proliferation through SWI/SNF. *Molecular and Cellular Biology* 25(6), S. 2200-2215.
- Lonard, D., & O'Malley, B. (Oktober 2012). Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nat Rev Endocrinol* 8(10), S. 598-604.
- Lumbroso, S., Lobaccaro, J., & Vial, C. (1997). Molecular analysis of the androgen receptor gene in Kennedy's disease. Report of two families and review of the literature. *Horm Res*, 23-29.
- Lundin, K., Giwercman, A., Richthoff, J., Abrahamsson, P.-A., & Giwercman, Y. (2003). No association between mutations in the human androgen receptor GGN repeat and inter-sex conditions. *Molecular Human Reproduction* 9 (7), S. 375-379.
- Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S., & Imataka, H. (2007). Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *The EMBO Journal* 26, S. 3373-3383.
- Matias, P., Donner, P., Coelho, R., Thomaz, M., Peixoto, C., Macedo, S., et al. (2000). Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenetic gene mutations. *J Biol Chem* 275(34), S. 26164-26171.
- Matsumoto, T., Sakari, M., Okada, M., Yokoyama, A., Takahashi, S., et al. (2013). The Androgen Receptor in Health and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 75, S. 201-224.
- Mendonca, B., Domenice, S., Arnhold, I., & Costa, E. (2009). 46, XY disorders of sex development (DSD). *Clinical Endocrinology* 70, S. 173-187.
- Millard, C., Watson, P., Fairall, L., & Schwabe, J. (2013). An evolving understanding of nuclear receptor coregulator proteins. *Society of Endocrinology* 51:3, S. 23-36.
- Mills, I., Gaughan, L., Robson, C., Ross, T., McCracken, S., Kelly, J., et al. (Juli 2005). Huntingtin interacting protein 1 modulates the transcriptional activity of nuclear hormone receptors. *The Journal of Cell Biology* 170 (2), S. 191-200.

- Miralles, F., & Visa, N. (Mai 2006). Actin in transcription and transcription regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 18(3), S. 261-266.
- Mittwoch, U. (2000). Genetics of Sex Determination: Exceptions That Prove the Rule. *Molecular Genetics and Metabolism* 71, 405-410.
- Miyagawa, S., Matsumaru, D., Murashima, A., Omori, A., Satoh, Y., Haraguchi, R., et al. (Juli 2011). The Role of Sonic Hedgehog-Gli2 Pathway in the Masculinization of External Genitalia. *Endocrinology* 152 (7), S. 2894-2903.
- Miyagawa, S., Moon, A., Haraguchi, R., Inoue, C., Harada, M., Nakahara, C., et al. (Oktober 2009). Dosage-dependent hedgehog signals integrated with Wnt/ β -catenin signaling regulate external genitalia formation as an appendicular program. *Development* 136, S. 3969-3978.
- Miyagawa, Satoh, Haraguchi, & Suzuki. (Juni 2009 b). Genetic Interactions of the Androgen and Wnt/ β -catenin pathways for the masculinisation of external genitalia. *Mol Endocrinol*, S. 871-880.
- Moras, D., & Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* 10, S. 384-391.
- Murashima, A., Kishigami, S., Thomson, A., & Yamada, G. (Februar 2015). Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochimica et Biophysica Acta*, S. 163-170.
- Nameki, N., Yoneyama, M., Koshiba, S., Tochio, N., Inoue, M., Seki, E., et al. (2004). Solution structure of the RWD domain of the mouse GCN2 protein. *Protein Science* 13, S. 2089-2100.
- Need, E., Scher, H., Peters, A., Moore, N., Cheong, A., Ryan, C., et al. (März 2009). A novel androgen receptor amino terminal region reveals two classes of amino/carboxyl interaction (N/C) deficient variants with divergent capacity to activate responsive sites in chromatin. *Endocrinology* 150, S. 2674-2682 .
- Nef, S., & Parada, L. F. (2000). Hormones in male sexual development. *Genes & Development*, S. 3075-3086.
- New, M., Nimkarn, S. B., Cunningham-Rundles, S., Wilson, R., Newfield, R., Vandermeulen, J., et al. (2001). Resistance to multiple steroids in two sisters. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76, S. 161-166.
- Ng, S., Bidarkar, S., Sourial, M., Farmer, P., Donath, S., & Hutson, J. (Februar 2005). Gubernacular cell division in different rodent models of

- cryptorchism supports indirect androgenic action via the genitofemoral nerve. . *Journal of Pediatric Surgery* 40(2), S. 434-441.
- Nishimura, K., Ting, H.-J., Harada, Y., Tokizane, T., Nonomura, N., Kang, H.-Y., et al. (August 2003). Modulation of Androgen Receptor Transactivation by Gelsolin: A Newly Identified Androgen Receptor Coregulator. *Cancer Research* 63, S. 4888-4894.
- Ohnesorg, T., Vilain, E., & Sinclair, A. H. (Januar 2014). The Genetics of Disorders of Sex Development in Humans. *Sexual Development* 8, S. 262-272.
- O'Malley, B., Qin, J., & Lanz, R. (2008). Cracking the coregulator codes. *Current Opinion in Cell Biology* 20, S. 310-315.
- Onate, S., Tsai, S., Tsai, M., & O'Malley, B. (Dezember 1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270 (5240), S. 1354-1357.
- Page, G., I., L., Kögel, D., & Scheidtmann, K. (November 1999). AATF, a novel transcription factor that interacts with Dll/ZIP kinase and interferes with apoptosis. *FEBS Lett.*, S. 187-191.
- Pawlowski, J. E., Ertel, J., Allen, M., Yu, M., Butler, C., Wilson, E., et al. (Juni 2002). Liganded Androgen Receptor Interaction with β -catenin. *The Journal of Biological Chemistry Vol 277, No 23*, S. 20702-20710.
- Peterson, T., Karmakar, S., Pace, M., Gao, T., & Smith, C. (2007). The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) corepressor is required for full estrogen receptor alpha transcriptional activity. *Molecular and Cellular Biology* 27, S. 5933-5948.
- Petrij, F., Giles, R., Danworse, H., Saris, J., R.C., H., Masuno, M., et al. (Juli 1995). Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376(6538), S. 348-351.
- Pihlajamaa, P., Sahu, B., & Jänne, O. (August 2015). Determinants of Receptor- and Tissue-Specific Actions in Androgen Signaling. *Endocrine Reviews* 36,4, S. 357-384.
- Plevin, M., Mills, M., & Ikura, M. (Februar 2005). The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. *TRENDS in Biochemical Sciences* 30,2, S. 66-70.

- Qi, J., Dong, Z., Liu, J., & Zhang, J.-T. (August 2014). EIF3i Promotes Colon Oncogenesis by Regulating COX-2 Protein Synthesis and β -Catenin Activation. *Oncogene* 33(32), S. 4156-4163.
- Qin, L., Liu, Z., Chen, H., & Xu, J. (1. Mai 2009). The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer Res.*; 69(9), S. 3819-3827.
- Quigley, C. A., de Bellis, A., Marschke, K. B., El-Awady, M., Wilson, E., & French, F. (1995). Androgen Receptor Defects: Historical, Clinical, and Molecular Perspectives. *Endocrine Reviews*, 16 (3), S. 271-321.
- Röpke, Allhoff, & Wieacker. (2004). Mutationen des Androgenrezeptor-Gens als mögliche Ursache der Antiandrogenresistenz beim Prostatakarzinom. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie*, 193-201.
- Ross, & Capel. (2005). Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol. Metab.*, 19-25.
- Ross, A. J., & Capel, B. (2005). Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16 (1), S. 19-25.
- Rouleau, Domans'kyi, Reeben, Moilanen, Havas, Kang, et al. (2002). Novel ATPase of SNF2-like protein family interacts with androgen receptor and modulates androgen-dependent transcription. *Mol Biol Cell*, 2106-2119.
- Sadler, T. (2003). Medizinische Embryologie. Georg Thieme Verlag.
- Satoh, Haraguchi, Wright, & Mansour. (2004). Regulation of external genitalia development by concerted actions of FGF ligands and FGF receptors. *Anatomy and embryology*, 479-486.
- Schaufele, F., Carbonell, X., Guerbador, M., Borngraeber, S., Chapman, M. S., Ma, A. A., et al. (Juli 2005). The structural basis of androgen receptor activation: Intramolecular and intermolecular amino-carboxyl interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) Vol. 102*, S. 9802-9807.
- Schranz, N., da Silva Correia, J., Fowler, B., Ge, Q., Sun, Z., & Bokoch, G. (Januar 2004). Mechanism of p21-activated Kinase 6-mediated Inhibition of Androgen Receptor Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (3), S. 1922-1931.

- Seifert, A., Zheng, Z., Ormerod, B., & Cohn, M. (Juni 2010). Sonic hedgehog controls growth of external genitalia by regulating cell cycle kinetics. *Nature Communications*.
- Shen, H. C., Buchanan, G., Butler, L., Prescott, J., Henderson, M., Tilley, W., et al. (Januar 2005). GRIPI mediates the interaction between the amino- and carboxyl-termini on the androgen receptor. *Biol. Chem. Vol 386*, S. 69-74.
- Sigel, A. (2007). *Kinderurologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH.
- Siiteri, P., & Wilson, J. (Januar 1974). Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J Clin Endocrinol Metab*, 38 (1), S. 113-125.
- Stashi, E., York, B., & O'Malley, B. (Juli 2014). Steroid Receptor Coactivators: Servants and Masters for Control of Systems Metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 25(7), S. 337-347.
- Stehr, M., & Schuster, T. (2004). Hypospadie - häufigste Fehlbildung des Knaben, Ätiologie, Therapie und Ergebnisse. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 7.
- Suzuki, K., Ogino, Y., Murakami, R., Satoh, Y., Bachiller, D., & Yamada, G. (2002). Embryonic development of mouse external genitalia: insights into a unique mode of organogenesis. *Evolution and Development* 4:2, S. 133-141.
- Tahiri, B., Auzou, G., Nicolas, J.-C., Sultan, C., & Lupo, B. (2001). Participation of Critical Residues from the Extreme C-Terminal End of the Human Androgen Receptor in the Ligand Binding Function. *Biochemistry Volume* 40, S. 8432-8437.
- Thompson, J., Lepikhova, T., Teixido-Travesa, N., Whitehead, M., Palvimo, J., & Jänne, O. (2006). Small carboxyl-terminal domain phosphatase 2 attenuates androgen-dependent transcription. *The EMBO Journal* 25, S. 2757-2767.
- Trapman, J., & Dubbink, E. J. (2007). The role of cofactors in sex steroid action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21, S. 403-414.
- van de Wijngaart, D. J., Dubbink, H. J., Molier, M., de Vos, C., Trapman, J., & Jenster, G. (November 2009). Functional Screening of FxxLF-Like Peptide Motifs Identifies SMARCD1/BAF60a as an Androgen Receptor Cofactor that Modulates TMPRSS2 Expression. *Mol Endocrinol*, 23 (11), S. 1776-1786.

- van de Wijngaart, D. J., van Royen, M. E., Pike, A. C., Houtsmuller, A. B., Jenster, G., Trapman, J., et al. (Juli 2006). Novel FXXFF and FXXMF Motifs in Androgen Receptor Cofactors Mediate High Affinity and Specific Interactions with the Ligand-binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry* 281(28), S. 19407-19416.
- van de Wijngaart, D., Dubbink, H., van Royen, M., & Trapman, J. (April 2012). Androgen receptor coregulators: Recruitment via the coactivator binding groove. *Molecular and Cellular Endocrinology*, S. 57-69.
- van Royen, M., Cunha, S., Brink, M., Mattern, K., Nigg, A., Dubbink, H., et al. (April 2007). Copartmentalization of androgen receptor protein-protein interactions in living cells. *The Journal of Cell Biology* 177 (1), S. 63-72.
- Verrujdt, G., Tanner, T., Moehren, U., Callewaert, L., Haelens, A., & Claessens, F. (Juni 2006). The androgen receptor DNA-binding domain determines androgen selectivity of transcriptional response. *Biochemical Society Transactions* 34(6), S. 1089-1094.
- Wang, J., Mager, J., Chen, Y., Schneider, E., Cross, J., Nagy, A., et al. (August 2001). Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. *Nature Genetics* Vol 28, S. 371-375.
- Wang, L. H.-L., Ni, J., Wang, P.-H., Yeh, S., Keng, P., & Chang, C. (März 2004). Human Checkpoint Protein hRad9 Functions as a Negativ Coregulator to Repress Androgen Receptor Transactivation in Prostate Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology* 24(5), S. 2202-2213.
- Wang, X., Yang, Y., Guo, X., Sampson, E., Hsu, C., Tsai, M., et al. (Mai 2002). Suppression of androgen receptor transactivation by Pyk2 via interaction and phosphorylation of the ARA55 coregulator. *J Biol Chem* 277(18), S. 15426-15431.
- Ward, R. D., & Weigel, N. L. (2009). Steroid Receptor Phosphorylation: Assigning Function to Site-Specific Phosphorylation. *Biofactors* 35(6), S. 528-536.
- Werner, R., & Holterhus, P.-M. (2014). Androgen Action. *Endocrine Development* 27, S. 28-40.
- Werner, R., Grötsch, H., & Hiort, O. (2010). 46, XY Disorders of Sex Development - The Undermasculinized Male with Disorders of Androgen Action. *Best practise & research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 24, S. 263-277.

- Werner, R., Holterhus, P.-M., Binder, G., Schwarz, H.-P., Morlot, M., Struve, D., et al. (2006). The A645D Mutation in the Hinge Region of the Human Androgen Receptor (AR) Gene Modulates AR Activity, Depending on the Context of the Polymorphic Glutamine and Glycine Repeats. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91, S. 3515-3520.
- Werner, R., Mönig, I., August, J., Freiberg, C., Lünstedt, R., Reiz, B., et al. (September 2015). Novel Insights into 46,XY Disorders of Sex Development due to NR5A1 Gene Mutation. *Sexual Development* 9, S. 260-268.
- Werner, R., Zhan, J., Gesing, J., Struve, D., & Hiort, O. (2008). In-vitro Characterization of Androgen Receptor Mutations Associated with Complete Androgen Insensitivity Syndrome Reveals Distinct Functional Deficits. *Sexual Development*, S. 73-83.
- Wilhelm, D., Palmer, S., & Koopman, P. (Januar 2007). Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol Rev* 87, S. 1-28.
- Wilson, & Davies. (2007). The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction*, 331-359.
- Wu, S., & Zhang, Y. (September 2009). Minireview: Role of Protein Methylation and Demethylation in Nuclear Hormone Signaling. *Mol Endocrinol* 23(9), S. 1323-1334.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F., Tsai, S., Tsai, M.-J., & O'Malley, B. (März 1998). Partial Hormone Resistance in Mice with Disruption of the Steroid Receptor Coactivator-1 (SRC-1) Gene. *Science* 279, S. 1922-1925.
- Yamada, G., Satoh, Y., Baskin, L., & Cunha, G. (2003). Cellular and molecular mechanisms of development of the external genitalia. *Differentiation* 71, S. 445-460.
- Yamada, G., Suzuki, K., Haraguchi, R., Miyagawa, S., Satoh, Y., Kamimura, M., et al. (2006). Molecular Genetic Cascades for External Genitalia Formation: An Emerging Organogenesis Program. *Development Dynamics* 235, S. 1738-1752.
- Yang, F., Li, X., Sharma, M., Sasaki, C. L., Lim, B., & Sun, Z. (März 2002). Linking β -Catenin to Androgen-signalling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* Vol 277 No 13, S. 11336-11344.

- Yang, Z., Chang, Y.-J., Miyamoto, H., Yeh, S., Yao, J., di Sant'Agnes, P., et al. (November 2006). Suppression of Androgen Receptor Transactivation and Prostate Cancer Cell Growth by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 via Interaction with Androgen Receptor Coregulator ARA54. *Endocrinology* 148(3), S. 1340-1349.
- Ye, X., Han, S., Tsai, S., DeMayo, F., Xu, J., Tsai, M.-J., et al. (Juli 2005). Roles of steroid receptor coactivator (SRC)-1 and transcriptional intermediary factor (TIF) 2 in androgen receptor activity in mice. *PNAS* 102 (27), S. 9487-9492.
- Yong, E., Huynh, J., Farmer, P., Ong, S., Sourial, M., Donath, S., et al. (August 2008). Calcitonin gene-related peptide stimulates mitosis in the tip of the rat gubernaculum in vitro and provides the chemotactic signals to control gubernacular migration during testicular descent. *Journal of Pediatric Surgery* 43(8), S. 1533-1539.
- Yong, W., Yang, Z., Periyasamy, S., Chen, H., Yucel, S., Li, W., et al. (2006). Essential role for Co-chaperone FKBP52 but not FKBP51 in androgen receptor-mediated signaling and physiology. *J Biol Chem* 282(7), S. 5026-5036.
- Yuan, Y., Zhang, Y., Yao, S., Shi, H., Huang, X., Li, Y., et al. (August 2014). The Translation Initiation Factor eIF3i Up-regulates Vascular Endothelial Growth Factor A, Accelerates Cell Proliferation, and Promotes Angiogenesis in Embryonic Development and Tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 289(41), S. 28310-28323.
- Zhao, X., Gan, L., Pan, H., Kan, D., Majeski, M., Adam, S., et al. (März 2004). Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochem. J.*, S. 839-849.
- Zhao, Y., Zhou, L., Liu, B., Deng, Y., Wang, Y., Wang, Y., et al. (2006). ZNF325, a novel human zinc finger protein with RbA-like RB-binding domain, inhibits AP-1- and SRE-mediated transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346, S. 1191-1199.
- Zheng, B., Han, M., Bender, M., & Wen, J.-k. (2009). Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS Journal* 276, S. 2669-2685.

VII Anhang

1. Materialienindex

1.1 Allgemein verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glyzerol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Select Peptone	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Fluka, Schweiz
Trizma Base (Tris)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Select Tryptone	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	GIBCO, Invitrogen, USA
Select Yeast Extract	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	J.T.Baker, Holland

1.2 Für Bakterienkultur und Klonierung verwendete Reagenzien

Select-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA Ladder 100bp und 1kb	New England Biolabs, USA
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Kanamycin mg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LB Medium Capsuletten	QBioGene, USA
TE-Puffer (10mM TrisHCl, pH 8,0, 1 mM EDTA)	Qiagen, Hilden

1.3 Für Zellkultur und Transfektion verwendete Reagenzien

Aktivkohle (Norit A pract 4-7 µm)	Serva, Heidelberg
Dextran T300	Sigma, Deisenhofen
Dihydrotestosteron (DHT) 0,001 g/l in Ethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FCS	PAA, Cölbe
FuGene HD Transfection Reagent	Roche, USA
PBS Puffer 1, pH 7,2	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

1.4 Geräte und Computersoftware

Geräte	Bezugsfirma
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Genetic-Analyzer-3130 (Kapillarsequenzierer)	Applied Biosystems, Hitachi, USA
Lasergene 6.0 (SeqBuilder, SeqManager)	DNASStar, USA
Lucy 3 Luminometer	Anthos Mikrosysteme, Krefeld
Mastercycler-Gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikro-Rapid Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Nalgene-Cryo-Einfriergerät	NUNC Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden
Sorvall RC-5B-Refrigerated-Superspeed-Centrifuge mit GS3 Rotor	Thermo Scientific, Karlsruhe
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Schüttelinkubator Lab Therm	Kühner, Schweiz

Sequence Analysis 5.2	Applied Biosystems, USA
Thermomixer-Comfort	Eppendorf, Hamburg
Olympus CKX41 Mikroskop mit Olympus Kamera XC50 (5MP)	Olympus, Ulm, Deutschland

1.5 Einmalartikel

bio-one-CELLSTAR-TC-Plate 24-Well	Greiner, Solingen
Costar-Assay-Plate, 96-Well	Corning, USA
CryoTube	Nunc, Wiesbaden
Nunclon™ Surface 6-Well Platten	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen	Greiner, Solingen
10ml Röhrchen	Harre, Hannover
Zellkulturflaschen 175cm ² mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht

1.6 Kits

Matchmaker library construction and screening kit	Clontech, Mountain Views, GA, USA
Zymoprep I™ Yeast Plasmid Minipreparation, Catalog Nr. D2001; Lot No ZRC 161184	Zymo Research, Orange, CA, USA
RNA plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Agilent RNA 6000 kit und 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
BigDye® Terminator-v1.1-Cycle-Sequencing-Kit	Applied Biosystems, USA
Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System	Promega, USA
EndoFree-Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
High-Pure-PCR-Product-Purification-Kit	Roche, USA

Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep-Spin-Miniprep-Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter-Plasmid-Midi-Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript II Reverse Transcriptase, Cat. No. 18064-022	Invitrogen, Karlsruhe
Vectastain ABC Kit Cat. No. PK-6100	Vector Laboratories, USA

2. Primer

Name	Sequenz
Zfy1_s	5'-GAC TAG ACA TGT CTT AAC ATC TGT CC-3'
ZFy1_a	5'-CCT ATT GCA TGG ACA GCA GCT TTA TG-3'
MM-5pAD LD	5'-TTC CAC CCA AGC AGT GGT ATC AAC GCA GAG TGG-3'
MM-3pAD LD	5'-GTA TCG ATG CCC ACC CTC TAG AGG CCG AGG CGG CCG ACA-3'
heIF3i.-4.EcoRI.s	5'-ACCAAGAATTCCGGGATGAAGCCGATCCTAC-3'
heIF3i.STOP+5.XhoI.a	5'-ACAACCTCGAGCCAGCTTCTTAAGCCTCAAACCTC-3'

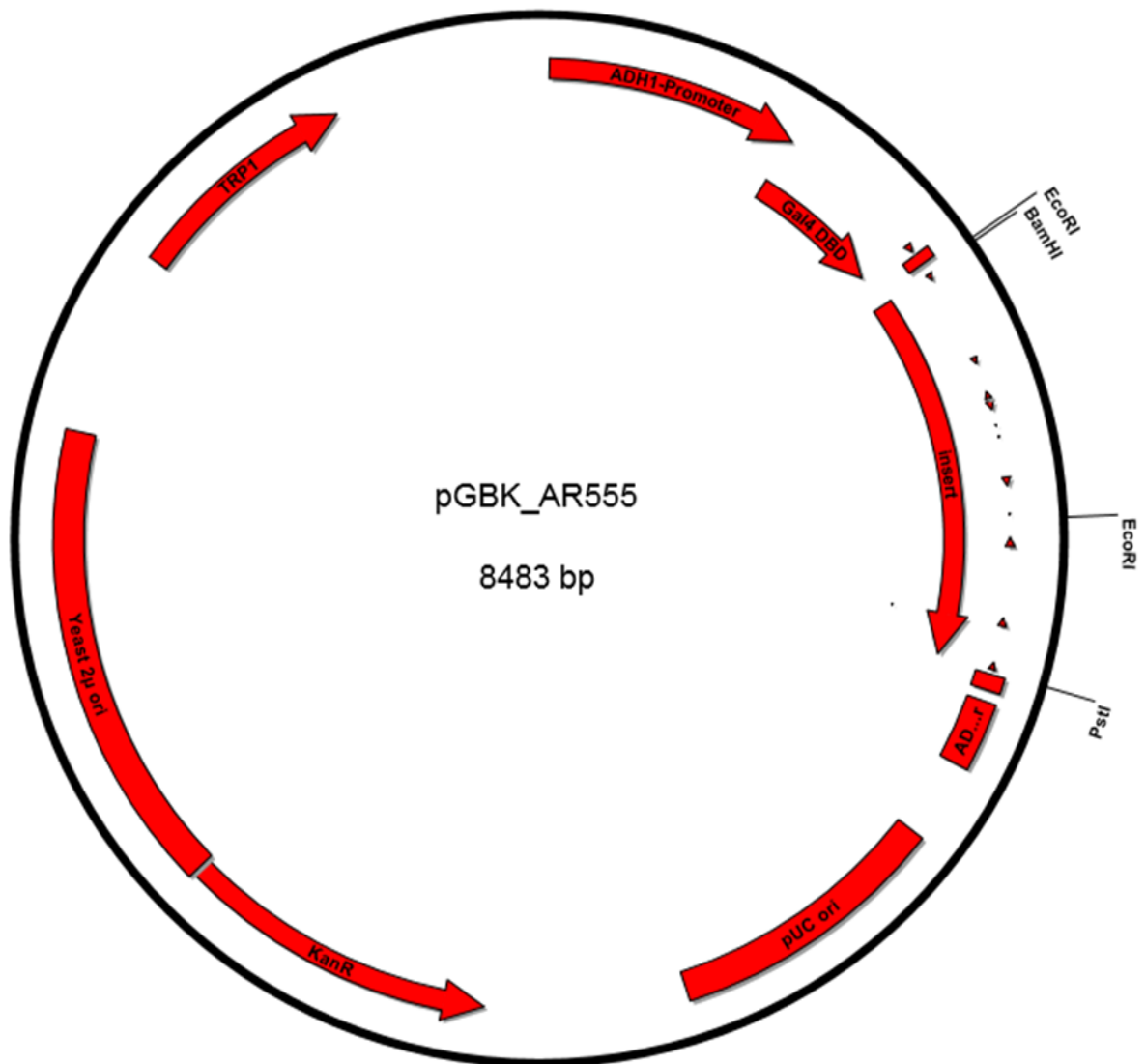
3. Plasmidlisten

pGBKT7	zu untersuchendes Protein kann als Fusion mit GAL4-DNA-BD exprimiert werden
pGADT7-Rec	zu untersuchendes Protein kann als Fusion mit GAL4-DNA-AD exprimiert werden
pGAD-Rec	Leeres Plasmid als Negativkontrolle bei Retransformationen
pGBK_AR555	Siehe 4.1

pGBK_AR618	
pGBK_AR645	
pSVAR0	Wildtyp Q16, G20
phRG-TK	Hier ist die Luziferase der <i>Renilla reniformis</i> kodiert.
phelF3i	eIF3i Expressionsplasmid (siehe 4.2)
(ARE) ₂ TATA-Luc	hat in seiner Promotorregion spezielle AREs, an die sich die DBD des AR anlagert und so die Expression des Luziferasegens (Luc-Gen) initiiert
pFR-Luc	setzt sich aus fünf aufeinander folgenden Hefe-Gal4-responsiven Elementen zusammen

4. Plasmidkarten

4.1 pGBK_AR555



Legende

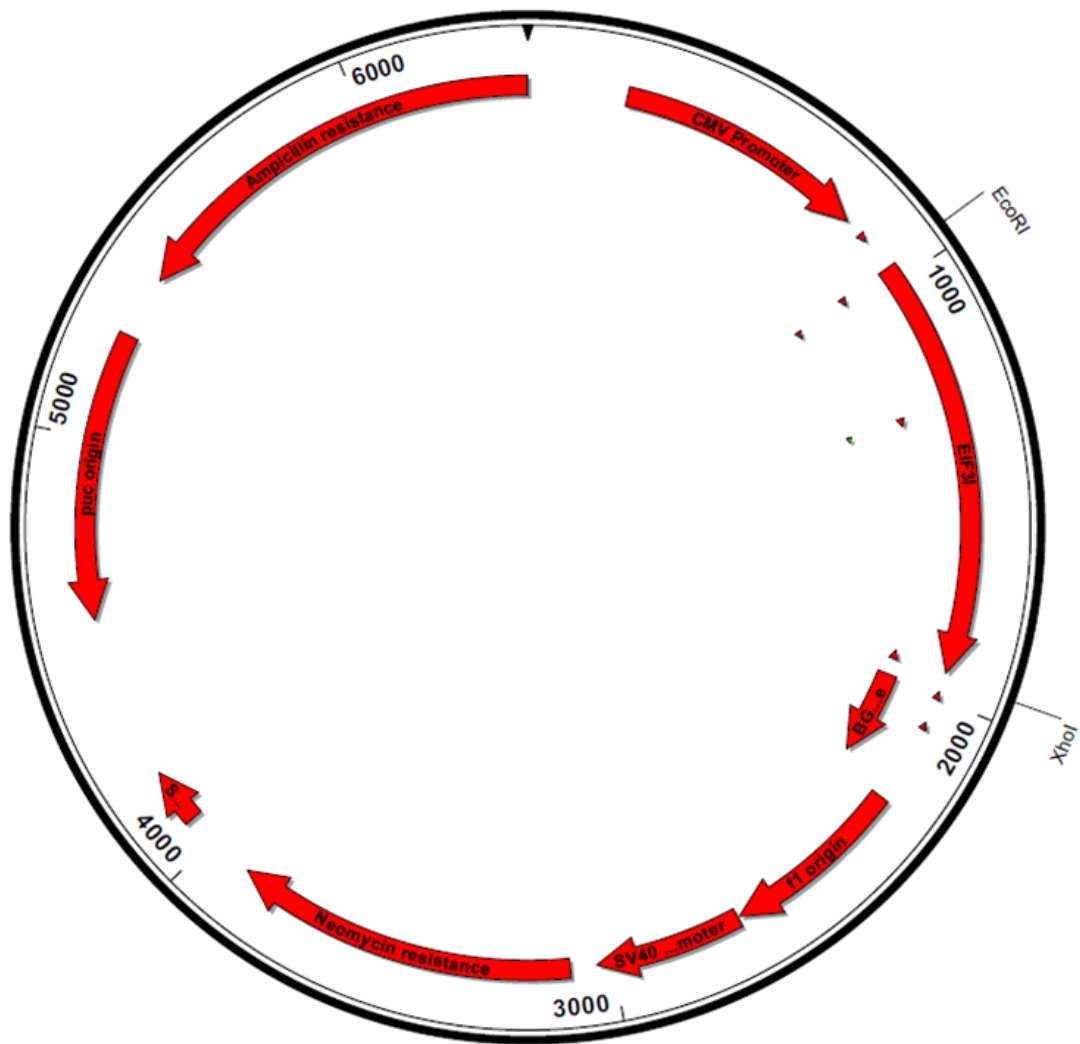
▷ Primer

▬ Position der mutierten Aminosäuren

▶ Gen

— Schnittstellen verwendeter Restriktionsenzyme

4.2 pHEF3i



Legende

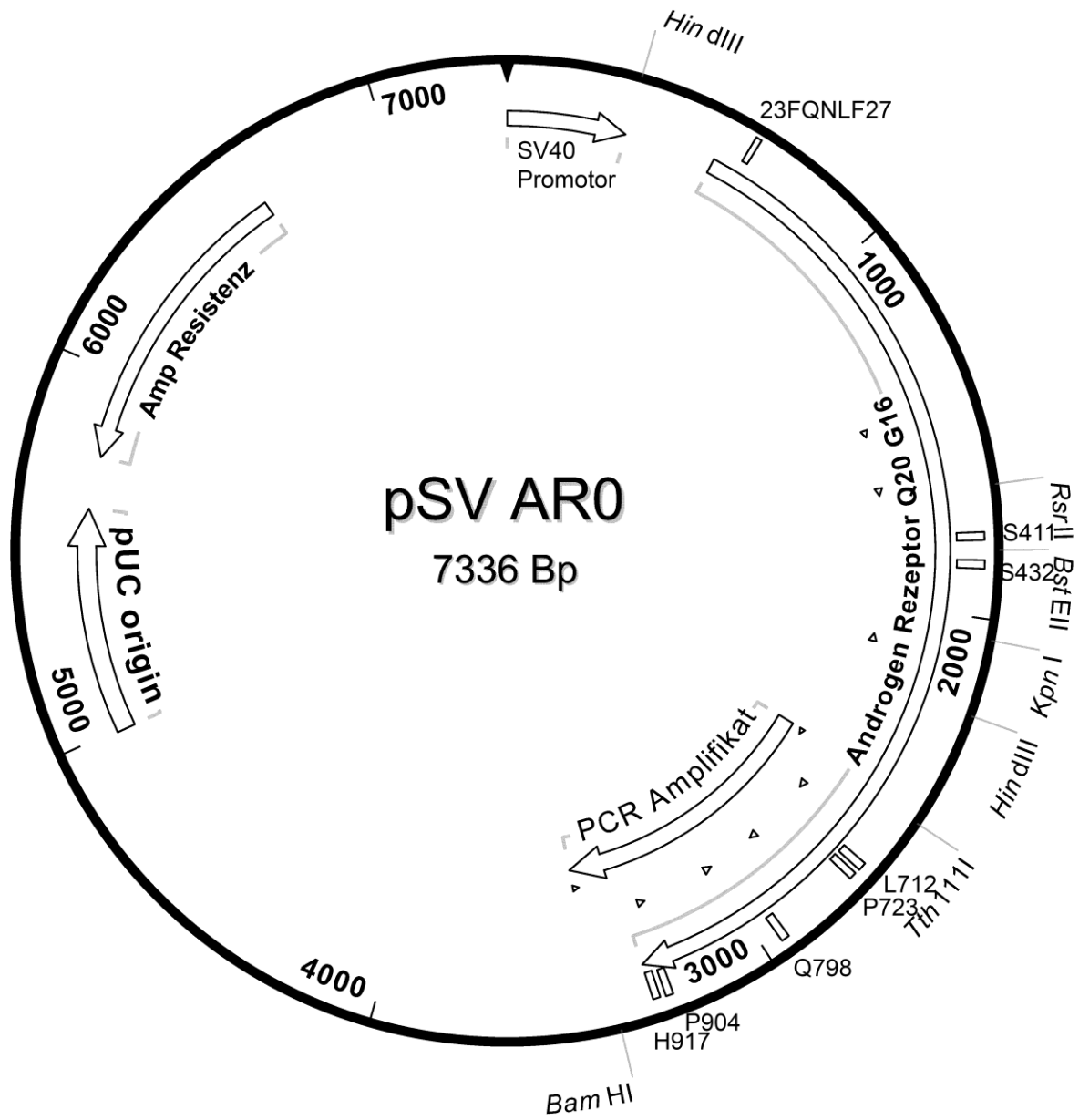
▷ Primer

— Position der mutierten Aminosäuren

▷ Gen

— Schnittstellen verwendeter Restriktionsenzyme

4.3 pSV AR0



Legende

- ▷ Primer
- ▬ Position der mutierten Aminosäuren
- ▭▶ Gen
- Schnittstellen verwendeter Restriktionsenzyme

5. Einbuchstaben-Code der Aminosäuren

Aminosäure	Buchstabe
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleuzin	I
Leuzin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

VIII Danksagung

In erster Linie möchte ich meiner wunderbaren Arbeitsgruppe danken, allen voran Dr. Helga Grötsch, die mir mit den Jahren eine gute Freundin geworden ist, Dr. Ralf Werner und Dagmar Struve. Ohne eure hohe Kompetenz, eure Hilfe zu jeder Zeit und eure offenen Ohren wäre es für mich schwer gewesen, zu einem Abschluss zu kommen. Natürlich danke ich auch meinem Doktorvater Prof. Olaf Hiort, der die Geduld aufbrachte und lange auf die Fertigstellung der Doktorarbeit warten musste. Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mir immer eine große Stütze waren.

IX Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Marlene Kunert
Geburtsdatum 23. März 1982
Geburtsort Schwerin



Berufliche Ausbildung

08/2001- 01/2003 Ausbildung zur Werbekauffrau
bei der CREA Werbeagentur in Osnabrück
02/2003- 09/2005 Werbekauffrau in Vollzeit
bei der CREA Werbeagentur in Osnabrück

Hochschulstudium

Seit 10/2005 Studium der Humanmedizin
an der Georg-August-Universität Göttingen
04/2008 Abschluss des ersten medizinischen Staatsexamens
Seit 04/2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Lübeck
05/2012 Abschluss des zweiten medizinischen Staatsexamens

Assistenzarztzeit

15.08.2012-31.08.2016 Assistenzärztin Kinder- und Jugendmedizin
Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein, Koblenz und Mayen
Seit 01.12.2016 Assistenzärztin Kinder- und Jugendmedizin,
Neonatalogie und pädiatrische Intensivmedizin
Katholisches Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg
Seit 23.01.2019 Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin

Zeitraum der Dissertation, experimenteller Teil

09/2009-12/2010

Publikationen

1) Grötsch, H.; Kunert, M.; Mooslehner, K.A.; Gao, Z.; Struve, D.; Hughes, I.A.; Hiort, O.; Werner, R.; "RWDD1 interacts with the ligand binding domain of the androgen receptor and acts as a coactivator of androgen-dependent transactivation", Mol Cell Endocrinol., 2012 Jul 6; 358 (1):53-62

2) Kunert, M., Grötsch, H.; Hiort, O.; Wünsch, L.; Werner, R.
Poster zum Doktorandentag der Universität Lübeck 2011 "Was macht die Maus zum Mäuserich"