

**Die Suszeptibilität der prämeiotischen und  
meiotischen männlichen Keimzelle zur malignen  
Transformation**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten**

**der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von**

**Sèmi Tascou**

**aus Kassel**

**Göttingen 2001**

D 7

Referent: Prof. Dr. W. Engel

Korreferent: Prof. Dr. U. Grossbach

Tag der mündlichen Prüfung:

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	3
<b>Abkürzungen</b> .....	11
<b>I. Einleitung</b> .....	14
<b>1. Testikuläre Keimzelltumore</b> .....	14
<b>2. Ziele der vorliegenden Arbeit</b> .....	18
2.1 Experimenteller <i>in vivo</i> Ansatz.....	18
2.1.1 Generierung transgener PGK2-LTA Mäuse.....	18
2.1.2 Generierung transgener TSPY-LTA Mäuse.....	19
2.2 Experimenteller <i>in vitro</i> Ansatz.....	19
2.2.1 Etablierung einer permanenten Spermatozytenzelllinie GC-4spc.....	19
2.2.2 Vergleich der GC-1spg Zelllinie mit der GC-4spc Zelllinie auf der Ebene des Phänotyps und auf der Ebene der Expression.....	20
2.2.3 Isolierung und Charakterisierung von Nif311 der Maus und NIF3L1 des Menschen.....	21
2.2.4 Isolierung und Charakterisierung der Interaktionspartner von NIF3L1.....	21
<b>II. Material und Methoden</b> .....	22
<b>1. Chemikalien</b> .....	22
<b>2. Gebrauchswaren</b> .....	24
<b>3. Sterilisation</b> .....	25
<b>4. Puffer und Stammlösungen</b> .....	25
<b>5. Medien, Antibiotika und Agarplatten</b> .....	33
5.1.1 Medien für Bakterien.....	33
5.1.2 Medien für Hefen.....	33
5.1.3 Medien für die Zellkultur.....	34
5.2 Antibiotika.....	35

5.3	IPTG/X-Gal-Platten.....	35
<b>6.</b>	<b>Verwendete Bakterien- und Hefestämme, Vektoren, Oligonukleotide, Bibliotheken, Zelllinien, Mausstämme und Datenbanken.....</b>	<b>36</b>
6.1	Bakterien- und Hefestämme.....	36
6.2	Vektoren.....	36
6.3	Synthetische Oligonukleotide.....	37
6.4	Bibliotheken.....	37
6.5	Eukaryotische Zelllinien.....	37
6.6	Mausstämme.....	38
6.7	Datenbanken.....	38
<b>7.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>38</b>
7.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	39
7.1.1	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	39
7.1.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	39
7.1.3	Isolierung genomischer DNA aus Organen.....	39
7.1.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben.....	40
7.1.5	Isolierung von PolyA(+) RNA.....	40
7.1.6	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	40
7.2	Enzymatische Modifikation von DNA: Klonierungstechniken.....	41
7.2.1	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA.....	41
7.2.2	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	41
7.2.3	Ligation eines DNA-Inserts in einen Plasmid-Vektor.....	41
7.2.4	Transformation von Bakterien.....	42
7.3	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	42
7.3.1	Gelelektrophorese von DNA.....	42
7.3.2	Gelelektrophorese von RNA.....	43
7.3.3	Längenstandards.....	43
7.3.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel.....	43
7.4	Transfertechniken von Nukleinsäuren.....	44
7.4.1	Transfer von DNA-Fragmenten: Southern-Blotting.....	44
7.4.2	Transfer von RNA aus Agarosegelen (Northern-Blotting).....	44

7.5	Radioaktive Markierung von DNA und Hybridisierung.....	44
7.5.1	"random priming".....	44
7.5.2	Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundene DNA oder RNA.....	45
7.5.3	Hybridisierung von RZPD-Filtern.....	45
7.6	Methoden der "Polymerase Chain Reaction" (PCR).....	46
7.6.1	PCR an Plasmid-DNA.....	46
7.6.2	PCR an genomischer DNA.....	47
7.6.3	"Reverse-Transkriptase PCR" (RT-PCR).....	47
7.7	Sequenzierungsanalyse.....	48
7.8	Subtraktive Hybridisierung (SH).....	49
7.9	Chromosomale Lokalisation mittels Fluoreszenz- <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	52
<b>8.</b>	<b>Proteinbiochemische Techniken.....</b>	<b>52</b>
8.1	Isolierung von Gesamtproteinen aus Gewebe.....	52
8.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	53
8.3	SDS-Polyacrylamidgel.....	53
8.4	Transfer von Proteinen mittels "Semi dry blot".....	54
8.5	Färbung von Polyacrylamidgelen.....	55
8.6	Immunumsetzung von Proteinmembranen.....	55
8.7	Yeast –Two-Hybrid-Screening.....	56
8.7.1	Beschreibung der eingesetzten Materialien.....	57
8.7.2	Transformation von pGBT9-NIF3L1 im kleinen Ansatz.....	58
8.7.3	Transformation von pGADGH/ cDNA-Bibliothek im großen Ansatz.....	59
8.7.4	Selektion relevanter Transformanten.....	59
8.7.5	Verifikation positiver Klone durch Erzeugung von Segreganten.....	60
8.7.6	Isolierung des AD-Plasmids aus Hefezellen und Klon-Analyse.....	60
8.8	GST-Pulldown.....	61
8.8.1	Radioaktive <i>in vitro</i> Translation des Zielproteins.....	61
8.8.2	Expression und Isolierung der Kandidaten-Proteine als GST-Fusionsproteine.....	62

8.8.3 Pulldown-Inkubation und Analyse mittels SDS-Page und Autoradiographie .....	63
8.9 Mammalian-Two-Hybrid-System .....	63
8.9.1 Luminometrische Messungen .....	64
<b>9. Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>66</b>
9.1 Kultur eukaryontischer Zellen .....	66
9.2 Transfektionsmethoden .....	66
9.2.1 Transiente Transfektionen .....	66
9.2.2 Stabile Transfektionen: Herstellung einer immortalisierten Spermatozyten-Zelllinie GC-4spc .....	67
9.3 CAT-ELISA .....	67
9.4 Matrigel Assay .....	68
9.5 Immunhistochemische Färbung eukaryontischer Zellen .....	69
9.6 Zelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen .....	70
<b>10. Methoden zur Erzeugung transgener Mäuse .....</b>	<b>70</b>
10.1 Vorbereitung der DNA für die Mikroinjektion .....	71
10.2 Vorbereitung der Halte- und Injektionspipetten .....	71
10.3 Mikroinjektion .....	71
10.4 Retransfer mikroinjizierter Oozyten .....	72
<b>11. Histologische Techniken .....</b>	<b>73</b>
11.1 Herstellung von Paraffinschnitten aus Geweben und Organen .....	73
11.2 Hämalaun-Eosin Färbung von Testisschnitten .....	73
11.3 Keimzellseparation .....	74
11.4 Immunlokalisierung von Proteinen in Paraffinschnitten .....	75
11.5 <i>In-Situ</i> End-Labeling (ISEL) .....	75
11.6 Quantifizierung von Spermatozyten, Spermatischen und Sertoli-Zellen .....	76

<b>III. Ergebnisse</b>	77
<b>1. PGK2-LTA transgene Mäuse</b>	77
1.1 Herstellung des PGK2-LTA Konstrukts für die Mikroinjektion	77
1.2 Erzeugung transgener Mäuse	79
1.3 Expressionsanalysen in PGK2-LTA transgenen Mäusen	80
1.3.1 Northern Blot-Analysen	80
1.3.2 RT-PCR-Analysen	81
1.3.3 Western Blot-Analysen	82
1.4 Histologische Untersuchungen	83
1.5 Quantifizierung der Spermatozyten, Spermatischen und Sertoli-Zellen	83
1.6 Apoptose-Nachweis an Testisschnitten von PGK2-LTA transgenen Mäusen	86
<b>2. Wiederlegung der publizierten Darstellung, dass das Maus-homologe 135- kDa-<math>\alpha</math>-D-Mannosidase (MAN2B2)-Gen testis- und spermatogonien- spezifisch exprimiert wird</b>	89
2.1 Hintergrund	89
2.2 Expressionsanalyse des Maus-homologen MAN2B2-Gens	89
<b>3. TSPY-LTA transgene Mäuse</b>	91
3.1 Herstellung eines TSPY-LTA Konstruktes	91
3.2 Erzeugung transgener TSPY-LTA Mäuse	92
3.3 Analyse der F1-Generation	93
3.4 Expressionsanalyse für LTA	94
3.5 Ausbildung von Tumoren bei den TSPY-LTA transgenen Mäusen	95
<b>4. Etablierung einer immortalisierten Spermatozytenzelllinie GC-4spc mit Hilfe des Promotor-basierten Selektionsverfahrens</b>	96
4.1 Herstellung der Konstrukte	96
4.2 Etablierung der immortalisierten Spermatozytenzelllinie GC-4spc	98
4.3 Expressionsanalyse für Neomycin und SV40 large T Antigen in GC-1spg- und in GC-4spc-Zellen	99
4.4 Expression keimzellspezifischer Marker in der GC-4spc Zelllinie	101

4.5	Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität keimzellspezifischer Promotoren in der GC-4spc- und in der GC-1spg- Zelllinie.....	104
<b>5.</b>	<b>Vergleich der Spermatogonienzelllinie GC-1spg mit der Spermatozytenzelllinie GC-4spc auf der Ebene des Phänotyps und auf der Ebene der Expression.....</b>	<b>105</b>
5.1	Phänotypischer Vergleich zwischen GC-1spg und GC-4spc.....	105
5.1.1	Proliferationsvergleich.....	105
5.1.2	Invasivitätsassay.....	106
5.2	Differentielle Genexpression in GC-1spg und GC-4spc.....	107
5.2.1	Differentielle Expression des onkofetalen Tumormarkers GCAP und des äquivalenten Maus-Isoenzym EAP.....	107
5.2.2	Bestimmung der transkriptionellen Aktivität einer 5'-flankierenden Region des humanen GCAP-Gens in GC-1spg und GC-4spc.....	109
5.2.3	Isolierung differentiell exprimierter Gene in GC-1spg über subtraktive Hybridisierung (SH).....	110
<b>6.</b>	<b>Isolierung, Charakterisierung und funktionelle Untersuchungen zu NIF3L1 und seines Maus-homologen Nif3l1.....</b>	<b>115</b>
6.1	Isolierung der „full-length“ cDNA für das Maus-Nif3l1 und für das humane NIF3L1.....	115
6.2	Expressionsanalysen von Maus-Nif3l1.....	120
6.3	Genomische Struktur und chromosomale Lokalisation von NIF3L1 und seines Maus-homologen Nif3l1.....	122
6.4	Zelluläre Lokalisation des NIF3L1-GFP-Fusionsproteins in Säugerzellen.....	125
<b>7.</b>	<b>Screening einer HeLa-cDNA-Bibliothek unter Verwendung des Yeast-Two-Hybrid-Systems.....</b>	<b>126</b>
7.1	Bestimmung der Transformationseffizienz und der Anzahl der getesteten Klone.....	127
7.2	Identifikation von HIS3- und lacZ- positiven Hefetransformanten.....	127
7.3	Verifikation positiver Klone durch Segregation.....	128
7.4	Identifizierung der isolierten cDNA-Klone.....	130



<b>8. GST-Pulldown</b> .....	132
8.1 Generierung der Fusionskonstrukte.....	132
8.2 Expression der GST-Fusionsproteine und <i>in vitro</i> Translation von NIF3L1.....	133
8.3 GST-Pulldown.....	134
<b>9. Mammalian-Two-Hybrid</b> .....	135
9.1 Generierung der Fusionskonstrukte.....	136
9.2 Transfektion der NIH3T3-Fibroblasten.....	137
<b>10. Charakterisierung des Interaktionspartners IF1</b> .....	140
10.1 Isolierung der humanen IF1- und der Maus-homologen If1 cDNA.....	140
10.2 Genomische Struktur und chromosomale Lokalisation von IF1.....	142
10.3 Zelluläre Lokalisation des IF1-GFP-Fusionsproteins in Säugerzellen.....	143
10.4 Expressionsanalyse des Maus-homologen If1.....	144
<b>IV. Diskussion</b> .....	145
<b>1. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse</b> .....	145
<b>2. Experimenteller <i>in vivo</i> Ansatz</b> .....	147
2.1 PGK2-LTA transgene Mäuse.....	148
2.2 TSPY-LTA transgene Mäuse.....	155
<b>3. Experimenteller <i>in vitro</i> Ansatz</b> .....	158
3.1 Etablierung einer neuen Spermatozytenzelllinie GC-4spc.....	158
3.2 Vergleich der GC-1spg Zelllinie mit der GC-4spc Zelllinie auf der Ebene des Phänotyps und auf der Ebene der Expression.....	161
<b>4. Charakterisierung und funktionelle Untersuchungen zu Nif3l1     der Maus und NIF3L1 des Menschen</b> .....	168
4.1 Analyse der Nif3l1 cDNA der Maus und der NIF3L1 cDNA des Menschen.....	168
4.2 Analyse der Primärstruktur des NIF3L1-Proteins.....	169
4.3 Expressionsanalysen von NIF3L1.....	172

4.4	Chromosomale Lokalisation des NIF3L1-Gens .....	172
4.5	Putative zelluläre Funktion von NIF3L1 .....	173
4.6	Isolierung von Interaktionspartnern für NIF3L1 .....	174
<b>5.</b>	<b>Charakterisierung von IF1 .....</b>	<b>176</b>
5.1	Analyse der IF1-cDNA .....	176
5.2	Analyse der Primärstruktur des IF1-Proteins .....	177
5.3	Expressionsanalysen von If1 .....	178
5.4	Chromosomale Lokalisation von IF1 .....	178
5.5	Zelluläre Lokalisation von IF1 .....	179
<b>6.</b>	<b>Evaluation der Interaktionen von NIF3L1 .....</b>	<b>180</b>
<b>7.</b>	<b>Ausblick auf weiterführende Arbeiten .....</b>	<b>183</b>
7.1	Weiterführende Analyse der TSPY-LTA transgenen Mäuse .....	183
7.2	Charakterisierung der überexprimierten Gene in der GC-1spg Zelle .....	183
7.3	Weiterführende funktionelle Untersuchungen zu NIF3L1 .....	184
7.4	Charakterisierung von IF1 als putatives Tumorsuppressorprotein .....	184
7.5	Weiterführende Analysen zum NIF3L1-IF1 Signaltransduktionsweg .....	185
7.6	Biochemische Charakterisierung der NIF3L1-Bindungsdomänen .....	185
<b>V.</b>	<b>Resümee .....</b>	<b>188</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>192</b>
<b>VII.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>210</b>

## Abkürzungen

A	Ampère
A	Purinbase Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Pyrimidinbase Cytosin
°C	Grad Celsius
cfu	colony forming units
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteres
Fa.	Firma
g	Gramm
x g	x Erdbeschleunigung
G	Purinbase Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
k	kilo- (1 x 10 <sup>3</sup> )
kb	Kilobasenpaare
l	Liter

## Abkürzungen

---

Lsg.	Lösung
m	milli- ( $1 \times 10^{-3}$ )
M	mega- ( $1 \times 10^6$ )
M	Molarität
MCS	„multiple cloning site“
$\mu$	mikro- ( $1 \times 10^{-6}$ )
min	Minute(n)
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
n	nano- ( $1 \times 10^{-9}$ )
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
Nr.	Nummer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
p	pico- ( $1 \times 10^{-12}$ )
PAA	Polyacrylamid
p.A.	per analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $H^+$ - Ionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Svedberg
T	Pyrimidinbase Thymidin
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris- (hydroxymethyl) aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U	Pyrimidinbase Uridin

ü.N.	über Nacht
UTR	nicht translatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt

### Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Aspargin oder Asparginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Aspargin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

## **I. Einleitung**

### **1. Testikuläre Keimzelltumore**

Obwohl testikuläre Keimzelltumore nur etwa 2% aller Neoplasien des Menschen ausmachen, sind sie in der Altersgruppe zwischen 20 und 45 Jahren die häufigste Krebserkrankung des Mannes (Schottenfeld et al., 1982). Verschiedene gonadale Abnormalitäten wie Kryptorchismus, testikuläre Dysgenie oder der Hypogonadismus beim Klinefelter-Syndrom korrelieren mit einer höheren Inzidenz an testikulären Keimzelltumoren (Tollerud et al., 1985). Eine genetische Prädisposition ist für testikuläre Keimzelltumoren höher als bei den meisten anderen Tumoren. So haben Brüder und Söhne von Patienten mit Keimzelltumoren ein acht- bis zehnfach bzw. ein vierfach erhöhtes Risiko ebenfalls Keimzelltumoren zu entwickeln (Forman et al., 1992). In diesem Zusammenhang konnte in einer kürzlich publizierten Studie erstmals ein Kandidatengen für testikuläre Keimzelltumoren auf Xq27 identifiziert werden (Rapley et al., 2000). Testikuläre Keimzelltumoren gehören zu den Krebserkrankungen mit der größten Heilungsrate. Aufgrund einer ausgesprochen erfolgreich ansprechenden Therapie mit dem Zytostatikum cis-Platin im Rahmen einer Kombinationschemotherapie betragen die Heilungschancen über 80% (Einhorn et al., 1990).

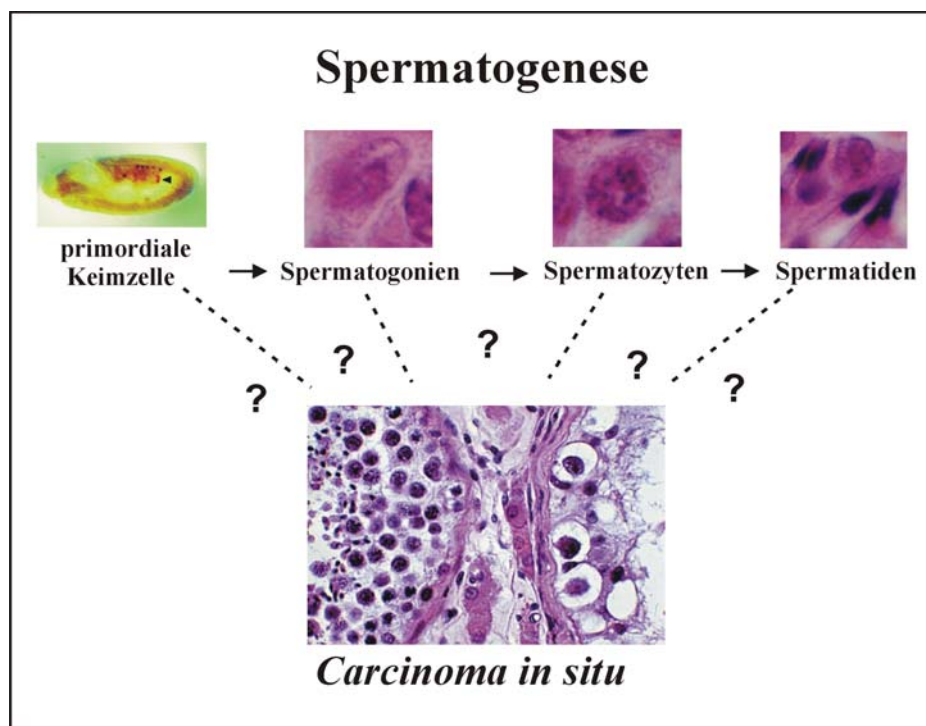
Ebenso einzigartig sind testikuläre Keimzelltumoren hinsichtlich ihrer Pluripotenz. Dies manifestiert sich vor allem in den vielen verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten der Tumoren. Histologisch werden testikuläre Keimzelltumoren in seminomatöse- und nichtseminomatöse Tumoren eingeteilt (Ulbright et al., 1993). Seminome ähneln morphologisch den Keimzellen. Nichtseminome zeigen eine ausgesprochene embryonale- und extra-embryonale Differenzierung. Im Rahmen einer extra-embryonalen Differenzierung entwickeln sich Dottersacktumore und Chorionkarzinome. Aus einer embryonalen Differenzierung gehen Embryonalkarzinome sowie Teratome hervor. Teratome repräsentieren hierbei die Gruppe der am weitesten und am vollständigsten differenzierten nichseminomatösen Keimzelltumoren (Ulbright et al., 1993).

Trotz der breiten Differenzierungsmöglichkeiten testikulärer Keimzelltumoren, entstehen diese ursprünglich aus einer gemeinsamen prämaligen Keimzelle (Präkanzerose) in den Tubuli seminiferi, die als *Carcinoma in situ* (CIS) bezeichnet wird (Skakkebaek et al., 1972).

Über die molekularen Mechanismen der Entstehung von testikulären Keimzelltumoren ist nur wenig bekannt. Karyotypanalysen in den Tumoren gaben diesbezüglich jedoch wertvolle Hinweise. So konnte das charakteristische Auftreten eines Isochromosoms 12p in den Tumoren von 90% aller Patienten gezeigt werden (Chaganti et al., 1993). In diesem Zusammenhang wird das Cyclin D2 (CCND2)-Gen, das auf Chromosom 12p13 beim Menschen lokalisiert ist, als ein Kandidatengen in Betracht gezogen, das im Prozess der Keimzelltransformation involviert sein soll (Houldsworth et al., 1997). Immunhistochemische Studien an normalen Testisschnitten zeigten eine schwache Expression von CCND2 in Spermatogonien. Testisschnitte mit einem CIS zeigten hingegen eine deutlich stärkere Expression von CCND2 in sämtlichen Keimzellen (Houldsworth et al., 1997). CCND2 gehört zu den D-Typ-Cyklinen, die die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRB) regulieren und damit den G<sub>1</sub>-S Zellzyklusübergang kontrollieren (Weinberg et al., 1995).

Obwohl man davon ausgeht, dass das CIS aus einer einzigen entarteten Keimzelle abstammt, ist wenig über den Ursprung und den Transformationszeitpunkt des CIS während der Spermatogenese bekannt. Die Spermatogenese ist ein hochkomplexer Differenzierungsprozess bei dem sich die primordialen Keimzellen in reife Spermatozoen entwickeln. Die Differenzierung erfolgt dabei über die Zwischenstadien der Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatozyten (Abb.1). Jedes dieser Zwischenstadien kennzeichnet sich durch komplexe morphologische und biochemische Veränderungen aus (Hecht et al., 1998). Über den Ursprung des CIS während der Spermatogenese gibt es verschiedene Theorien. So postulierten Skakkebaek et al. (1987) die entartete primordiale Keimzelle als den Transformationsursprung. Stützend für diese Theorie waren vor allem immunhistochemische Nachweise, da man eine Expression des c-kit-Rezeptors und der keimzellspezifischen alkalischen Phosphatase (GCAP) ausschließlich in den primordialen Keimzellen und im CIS detektieren konnte. Darüber hinaus suggerierten auch die epidemiologischen Daten von Testistumoren ein frühes, pränatales Stadium (primordiale Keimzelle) als Transformationsursprung. Andere Theorien hingegen sehen die entartete Spermatogonie als den Ausgangspunkt der Transformation (Grigor et al., 1998). Eine weitere, sehr intensiv diskutierte Hypothese bezeichnete das Differenzierungsstadium der Zygotän-

/Pachytänspermatozyten als Transformationsursprung (Chaganti et al., 2000). Begründet wurde diese Theorie durch die Koinzidenz spezifischer Eigenschaften und Merkmale des CIS, die mit dem Differenzierungsstadium der Zygotän-/Pachytänspermatozyten kompatibel sind. Diese Eigenschaften des CIS sind: eine Amplifikation des Chromosomenabschnitts 12p, eine konsistente triploide-tetraploide Chromosomenanzahl sowie eine relativ starke Expression von CCND2 und p53. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist jedoch nach wie vor unklar, welches Differenzierungsstadium während der Spermatogenese die Potenz zur malignen Transformation besitzt und damit als Transformationsursprung für testikuläre Keimzelltumoren in Betracht gezogen werden kann (Abb. 1). Nähere Erkenntnisse hierzu, können das allgemeine Verständnis für die molekularen Mechanismen von testikulären Keimzelltumoren verbessern.



**Abb. 1** Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, welches Differenzierungsstadium innerhalb des Verlaufs der Spermatogenese von der primordialen Keimzelle bis zu den Spermatoziden als Transformationsursprung des *Carcinoma in situ* zu betrachten ist.

Die bisherigen Modelle zur Beschreibung des Transformationsursprungs testikulärer Keimzelltumoren basieren in erster Linie auf einem Vergleich spezieller Eigenschaften und Merkmale des CIS (Morphologie, Expression spezifischer Markergene oder Chromosomenanoma-



lien) mit den jeweiligen Differenzierungsstadien der Spermatogenese. Behringer et al. (1988) verwendeten in diesem Zusammenhang erstmals das transgene Mausmodell, indem sie untersuchten, ob Spermatozyten über die Methode der zielgerichteten Onkogenese maligne transformiert werden können.

Die Methode der zielgerichteten Onkogenese wurde erstmals von Hanahan et al. (1985) beschrieben. Dabei entwickelten transgene Mäuse, die das SV40 large T Antigen unter der Kontrolle des Insulin II Promotors der Ratte exprimierten, Pankreastumoren (Hanahan et al., 1985). Die zielgerichtete Onkogenese im transgenen Mausmodell eröffnete eine neue Ära der Tumorforschung. Unter dem Einfluss gewebespezifischer und zelltypspezifischer Promotoren und einem viralen Onkogen war es nun möglich, Tumoren in einem bestimmten Gewebe entstehen zu lassen. Eines der am meisten verwendeten viralen Onkogene zur Immortalisierung und zur Transformation von Zellen ist das SV40 large T Antigen (LTA). Das LTA ist ein 94 kDa Protein, das aus 708 Aminosäuren besteht und in mehrere funktionelle Domänen unterteilt ist. Der Transformationseffekt des SV40 large T Antigens beruht unter anderem auf der Bindung und Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine Retinoblastom (RB) und p53 (Livingston et al., 1987).

In der o.g. Studie von Behringer et al. (1988) wurden transgene Mäuse generiert, die das SV40 large T Antigen unter der Kontrolle des Protamin 1-Promotors der Maus stadienspezifisch in den Spermatozyten exprimierten. Eine Expression von LTA wurde ab dem 25. Tag der testikulären Entwicklung festgestellt. Die transgenen Mäuse entwickelten jedoch keine Tumoren im Testis. Nayernia et al. (1998) generierten transgene Mäuse, die das LTA unter der Kontrolle des Proakrosin-Promotors der Ratte stadienspezifisch in den Spermatozyten ab dem 20. Tag der testikulären Entwicklung exprimierten. Auch hier konnte nach über 20 Monaten keine Tumorbildung im Testis beobachtet werden. Daraus wurde abgeleitet, dass Spermatozyten keine Suszeptibilität zur malignen Transformation besitzen (Nayernia et al., 1998).

In den letzten Jahren ist eine große Zahl von Genen isoliert worden, die stadienspezifisch in den männlichen Keimzellen exprimiert werden (Hecht et al., 1998), so dass der experimentelle Ansatz von Behringer et al. (1988) und Nayernia et al. (1998) auch auf die anderen Keimzellstadien angewendet werden kann. Die Generierung transgener Mäuse, die das SV40 large T Antigen jeweils stadienspezifisch in den primordialen Keimzellen, Spermatogonien und

Spermatozyten exprimieren, kann dazu beitragen, die Frage zu beantworten, welches Keimzellstadium während der Spermatogenese der Maus die Potenz zur malignen Transformation besitzt und somit potentiell auch als Transformationsursprung humaner testikulärer Keimzelltumoren in Betracht gezogen werden kann.

## 2. Ziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Potenz der Spermatogonien und der Spermatozyten zur malignen Transformation evaluiert werden. Hierfür haben wir uns des transgenen Mausmodells sowie etablierter Keimzellkulturen bedient. Diese beiden experimentellen Ansätze werden im folgenden unter einem experimentellen *in vivo*- und *in vitro* Ansatz beschrieben. In dem experimentellen *in vivo* Ansatz sollte das von Behringer et al. (1988) und Nayernia et al. (1998) beschriebene transgene Mausmodell verwendet werden. Dabei sollten transgene Mäuse generiert werden, die das SV40 large T Antigen stadienspezifisch in den Spermatozyten (PGK2-LTA) und in den Spermatogonien (TSPY-LTA) exprimieren. In dem *in vitro* Ansatz sollte die Potenz der Spermatogonien und Spermatozyten zur malignen Transformation unter Verwendung spezifischer immortalisierter Keimzellkulturen evaluiert werden. Diese sollten bezüglich ihrer Invasivität, ihres Proliferationsverhaltens und bezüglich ihrer differentiellen Genexpression analysiert werden.

### 2.1 Experimenteller *in vivo* Ansatz

#### 2.1.1 Generierung transgener PGK2-LTA Mäuse

Das Ziel war es, transgene Mäuse zu generieren, die das SV40 large T Antigen stadienspezifisch in den Spermatozyten exprimieren. Untersucht werden sollte, ob Spermatozyten durch eine zielgerichtete Expression eines viralen Onkogens maligne transformiert werden können. Für eine zielgerichtete Expression des LTA in den Spermatozyten wurde eine 1.4 kb große Promotorregion des humanen Phosphoglycerat-Kinase2 (PGK2)-Gens verwendet. Das PGK2-Gen kodiert für ein testisspezifisches Isoenzym, das bei Säugern keimzellspezifisch exprimiert wird. Bei der Maus wird das Pgk2-Gen ab dem 12. Tag in den Spermatozyten expri-

miert (McCarrey et al., 1992). Desweiteren zeigten *in vivo* Promotorstudien, dass eine 1.4 kb große 5'-flankierende Sequenz des humanen PGK2- Gens in transgenen Mäusen aktiv ist und zu einer testisspezifischen Expression eines Reportergens führt (Robinson et al., 1989). Von den generierten transgenen Mäusen sollten homozygote Linien aufgebaut werden. Diese sollten auf die Expression des LTA analysiert werden. Darüber hinaus sollten die transgenen Mäuse über eine Zeitspanne von mindestens 20 Monaten hinweg auf eine mögliche Tumorentstehung beobachtet werden.

### 2.1.2 Generierung transgener TSPY-LTA Mäuse

Um das LTA stadienspezifisch in den Spermatogonien zu exprimieren, wurde eine 1.3 kb große Promotorregion des humanen TSPY (testis-specific protein, Y-encoded)-Gens verwendet. Das TSPY-Gen ist beim Menschen auf dem Y-Chromosom lokalisiert und liegt in ca. 20-40 Kopien vor. Eine Expression von TSPY konnte beim Menschen ausschließlich im Testis detektiert werden. Antikörperfärbungen an Testisschnitten zeigten eine spezifische Expression von TSPY in Spermatogonien und vereinzelt auch in Spermatozyten (Schnieders et al., 1996). Darüber hinaus wurde auch eine erhöhte Expression von TSPY im CIS festgestellt (Schnieders et al., 1996). Bei der Maus liegt das Tspy-Gen als „single copy“-Gen vor und besitzt zahlreiche „in-frame“ Stopkodons innerhalb der kodierenden Sequenz, so dass es sich hier um ein transkribiertes Pseudogen handelt (Mazeyrat et al., 1998). Von den generierten transgenen Mäusen sollten homozygote Linien aufgebaut werden. Diese sollten auf die Expression des LTA analysiert werden. Darüber hinaus sollten die transgenen Mäuse über eine Zeitspanne von mindestens 20 Monaten auf eine Tumorentstehung im Testis beobachtet werden.

## 2.2 Experimenteller *in vitro* Ansatz

### 2.2.1 Etablierung einer permanenten Spermatozytenzelllinie GC-4spc

In den letzten 10 Jahren kam es zu bedeutenden Fortschritten bei der Etablierung permanenter Zelllinien, die die verschiedenen Zelltypen im Testis repräsentieren. So konnten unter anderem

bei der Maus eine Sertoli-Zelllinie, eine Peritubular-Zelllinie, eine Leydig-Zelllinie und verschiedene Keimzelllinien etabliert werden (Hofmann et al., 1992). Die Herstellung dieser permanenten Zelllinien basiert darauf, sämtliche isolierten Zellen mit einem viralen Onkogen unter der Kontrolle eines ubiquitär-aktiven Promotors zu transfizieren. Der Nachteil dieser konventionellen Methode ist jedoch eine geringere Spezifität des Zelltyps. Eine permanente Spermatozytenzelllinie der Maus (GC-4spc) sollte unter Verwendung eines neuen Promotor-basierten Selektionsverfahrens hergestellt werden. Entgegen der konventionellen Methode sollte jedoch eine höhere Spezifität des Zelltyps erreicht werden. Die etablierte GC-4spc Zelllinie sollte bezüglich ihrer Kulturbedingungen, ihres Wachstumsverhaltens und bezüglich ihres DNA-Gehalts analysiert werden. Darüber hinaus sollte die Stadienspezifität durch eine Expressionsanalyse spezifischer Markergene demonstriert werden.

### **2.2.2 Vergleich der GC-1spg Zelllinie mit der GC-4spc Zelllinie auf der Ebene des Phänotyps und auf der Ebene der Expression**

Eine permanente Spermatogonienzelllinie GC-1spg der Maus wurde von Hofmann et al. (1992) generiert. Diese wurde mit dem SV40 large T Antigen immortalisiert. Morphologisch konnte die GC-1spg Zelllinie einem Differenzierungsstadium zwischen den Spermatogonien des Typs B und den Präleptotänospermatozyten zugeordnet werden. Auf Expressionsebene konnten das testisspezifische Ldh-X sowie das testisspezifische Cytochrom C in der GC-1spg Zelllinie nachgewiesen werden.

Im folgenden sollte die Spermatogonienzelllinie GC-1spg mit der Spermatozytenzelllinie GC-4spc auf der Ebene des Phänotyps und auf der Expressionsebene verglichen werden. Der phänotypische Vergleich sollte das Proliferations- und das Invasionsverhalten beider Zelllinien untersuchen. Durch einen Vergleich auf der Ebene der Expression sollte zunächst das Expressionsmuster des Keimzelltumormarkers GCAP bzw. seines Maus-homologen EAP in beiden Zelllinien analysiert werden. Die GC-1spg Zelllinie zeigte ein erhöhtes invasives Potential, eine gesteigerte Proliferation sowie eine stärkere Expression des Tumormarkers GCAP bzw. seines Maus-homologen EAP. Aufgrund dieser Tatsache sollten über die Methode der subtraktiven Hybridisierung differentiell exprimierte Gene isoliert und charakterisiert werden, die potentiell für den Phänotyp der GC-1spg Zelllinie verantwortlich sind.

### **2.2.3 Isolierung und Charakterisierung von Nif3l1 der Maus und NIF3L1 des Menschen**

Über die Methode der subtraktiven Hybridisierung wurden verschiedene cDNAs isoliert, die in der GC-1spg Zelllinie differentiell exprimiert werden. In diesem Zusammenhang wurde auch das Nif3l1-Gen isoliert, welches in der GC-1spg Zelllinie überexprimiert ist. Im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Überexpression des Nif3l1-Gens und dem Phänotyp der GC-1spg Zelllinie sollte dieses Gen analysiert und charakterisiert werden. Das Nif3l1-Gen sollte zunächst bezüglich seiner cDNA-Struktur, seines Expressionsmusters sowie seiner chromosomalen und zellulären Lokalisation analysiert werden. Darüber hinaus sollten die humane NIF3L1-cDNA isoliert und die genomische Organisation des NIF3L1-Gens untersucht werden.

### **2.2.4 Isolierung und Charakterisierung der Interaktionspartner von NIF3L1**

Um Hinweise auf die Funktion von NIF3L1 innerhalb der zellulären Signaltransduktion zu bekommen, sollten unter Verwendung des Yeast-Two-Hybrid-Systems Interaktionspartner des humanen NIF3L1-Proteins isoliert werden. Die in Hefezellen nachgewiesenen putativen Interaktionen sollten durch einen *in vitro* Bindungstest (GST-Pulldown) und darüber hinaus mit Hilfe des Mammalian-Two-Hybrid-Systems verifiziert werden. Anschließend sollten die isolierten Interaktionspartner bezüglich ihrer cDNA-Struktur, ihrer genomischen Organisation und bezüglich ihrer zellulären- und chromosomalen Lokalisation evaluiert werden. Außerdem sollten die homologen cDNA-Sequenzen der Maus isoliert sowie die entsprechenden Expressionsmuster analysiert werden.

## II. Material und Methoden

### 1. Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p.A. Qualität bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Gibco/BRL, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Fluka, Neu Ulm
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroit, USA
Bindesilan	Fluka, Neu Ulm
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Blockierungspluver	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Biomol, Hamburg
Chloroform	Baker, Deventer, NL
Coomassie-Blau R-250	ICN, Eschwege
Dextransulfat	Amersham, Freiburg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Gibco-BRL
DNase I (RNase-frei)	Amersham, Freiburg
dNTPs (100 mM)	Boehringer, Mannheim
Entwickler	Kodak, Darmstadt
Ethanol	Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Amersham, Freiburg
FKS	Gibco/BRL, Karlsruhe
Formaldehyd	Gibco/BRL, Karlsruhe

## II. Material und Methoden

---

Formamid	Fluka, Neu Ulm
GeneClean-Kit	Dianova, Hamburg
Glycerol	Gibco/BRL, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Fluka, Neu Ulm
Harnstoff	ICN Biomedicals Inc., Cleveland, USA
Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren	Difco, Detroit, USA
Heparin	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Biomol, Hamburg
Jetsorb Gel Extraction Kit/300	Genomed, Bad Oeynhausen
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Klenow-DNA-Polymerase	Amersham, Braunschweig
Kb Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
Lachsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
Lambda-DNA	Boehringer, Mannheim
Levamisole	Fulka, Neu Ulm
LMP-Agarose	Gibco/BRL, Karlsruhe
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Amersham, Freiburg
Methylbenzoat	Fulka, Neu Ulm
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Multipriming Kit	Amersham, Braunschweig
Oligo (dT) Cellulose	Sigma, Deisenhofen
Orange-G	Sigma, Deisenhofen
PBS	Gibco/BRL, Karlsruhe
Parablast	Sigma, Deisenhofen
Pikrinsäure	Fulka, Neu Ulm
Phenol	Gibco/BRL, Karlsruhe
Plasmid-Midipräp Kit	Qiagen, Hilden
Phagen-Maxipräp Kit	Qiagen, Hilden
Polyethylenglycol 6000	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Radioaktiv markierte Reagenzien:	Amersham, Braunschweig
[ $\gamma$ <sup>32</sup> P]-dCTP, <sup>35</sup> S-Methionin	
Rediprime™ II	Amersham, Freiburg

Restriktionsenzyme	Gibco/BRL, Karlsruhe
Reverse Transkriptase	Gibco/BRL, Karlsruhe
RNase A	Gibco/BRL, Karlsruhe
RNase H	Gibco/BRL, Karlsruhe
RNase Inhibitor	Boehringer, Mannheim
RNA-Längenstandard	Gibco/BRL, Karlsruhe
RNA Now-Kit	ITC Biotchnology, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
Select Peptone	Gibco/BRL, Karlsruhe
SP6 RNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T <sub>4</sub> -DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T <sub>4</sub> -Polynukleotid-Kinase	Gibco/BRL, Karlsruhe
T7 RNA-polymerase	Boehringer, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Amersham, Braunschweig
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Sigma, Deisenhofen
t-RNA (Bäckerhefe)	Boehringer, Mannheim
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Biomol, Hamburg
Xylencyanol	Bio-Rad, München
Zellkulturmedien	Gibco/BRL, Karlsruhe; Sigma, Deisenhofen

## 2. Gebrauchswaren

Gebrauchswaren, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Schütt bzw. Krannich, Göttingen, bezogen.

Blottingpapier GB-002/003	Schleicher & Schuell, Dassel
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Einmalfilter Minisart	Sartorius, Göttingen
Hybond C Membran	Amersham, Braunschweig
Hybond N Membran	Amersham, Braunschweig



Membranfilter	Millipore, Molsheim
NAP <sup>TM</sup> 5 Sephadex G25-Säulen	Amersham, Freiburg
Nitrocellulosefilter BA 85	Schleicher & Schüll, Dassel
Petrischalen	Greiner Nunc., Nürtingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann, München
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Quarz-Küvetten	Hellma, Mühlheim
Röntgenfilme (Hyperfilm <sup>TM</sup> -MP)	Amersham, Braunschweig
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann, München
Zentrifugengefäße u. -röhrchen	Beckmann, München
Zellkulturflaschen	Greiner Nunc, Nürtingen

### 3. Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte für 60 min bei 120°C und 10<sup>5</sup> Pascal im Dampfdruckautoklaven (Webeco, Bad Schwartau) oder bei hitzeempfindlichen Lösungen durch Sterilfiltration (Porengröße: 0.2 µm). Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert.

### 4. Puffer und Stammlösungen

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Die benötigten Chemikalien wurden den Erfordernissen gemäß in bidestilliertem oder DEPC-behandeltem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder steril filtriert.

Acrylamid-Stammlösung (40%)	38 g Acrylamid
	2 g Bisacrylamid
	auf 100 ml H <sub>2</sub> O

## II. Material und Methoden

---

Bindepuffer für GST-Pulldown	50 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,5 100 mM KCL 10% Glycerol 0,1% Triton-X-100
BSA-Lösungen	0.5%, 2%, 4% und 10% BSA in ERKB-Puffer
BSA/DNase-Lösung:	0.5% BSA 1 µg/ml DNase I (20 mg/ml) in ERKB-Puffer
Collagenase-Lösung:	0.1% Collagenase in ERKB-Puffer
Denaturierungslösung	1.5 M NaCl 0.5 M NaOH
Denhardt's-Lösung (50x)	1% BSA 1% Polyvinylpyrrolidon 1% Ficoll 400 in 20 x SSC (pH 7.0)
dNTP-Mix (25 mM)	100 mM dATP 100 mM dGTP 100 mM dCTP 100 mM dTTP
Depurinierungslösung	0.25 M HCl
E-Puffer (10x)	300 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM EDTA
Elutionspuffer	1.5 M NaCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 1 mM EDTA
Entfärbelösung	30% Methanol 10% Eisessig

## II. Material und Methoden

---

Eosin-Stammlösung	1% Eosin 45.5% H <sub>2</sub> O 45.5% Ethanol
EKRB-Puffer:	120 mM NaCl 4.8 mM KCl 25.2 mM NaHCO <sub>3</sub> 1.2 mM MgSO <sub>4</sub> 11 mM Glucose 1 mM Glutamin (ad 1.5 l H <sub>2</sub> O/ pH 7.0) 1.3 mM CaCl <sub>2</sub> 6 mM Lactat 1 mM Pyruvat
Färbelösung	4,5 µl NBT (75 mg/ml in 70% DMF) 3,5 µl BCIP (50 mg/ml in 70% DMF) ad 10 ml Puffer 3
Fixiergemisch (Bouin'sches Fixativ)	15 Vol. Pikrinsäure (gesättigt in H <sub>2</sub> O) 5 Vol. Formaldehyd 1 Vol. Essigsäure
Fixiergemisch mit Paraformaldehyd	4% Paraformaldehyd gelöst in PBS
Glycylglycin-Puffer	25 mM Glycylglycin, pH 7,8 15 mM MgSO <sub>4</sub> 4 mM EDTA
GET-Puffer	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)
Hybridisierungslösung für RZPD-Filter	7% SDS 0,5 M Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer pH 7,2 1 mM EDTA

## II. Material und Methoden

---

Hybridisierungslösung	5x SSC 5x Denhardt's-Lösung 10% Dextransulfat 0.1% SDS
Hybridisierungspuffer (5x)	1.5 M NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 5 mM EDTA
Kinasepuffer (10x)	100 mM Tris-HCl (pH 7.4) 100 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM DTT 1 mM ATP
Lachs-Spermien-DNA	100 µg/ml
LB-Agar	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar auf 1000 ml H <sub>2</sub> O
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl auf 1000 ml H <sub>2</sub> O
Ligationspuffer (10x)	600 mM Tris-HCl (pH 7.5) 80 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM DTT
Lösung D	4.0 M Guanidiniumthiocyanat 25.0 mM Natriumcitrat (pH 7.0) 0.5% Sarcosyl 0.1 M β-2-Mercaptoethanol

## II. Material und Methoden

---

Lysis-Puffer I	100 mM NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM EDTA 0.2 mg/ml Proteinase K 0.5% SDS
Lysis-Puffer II	0.35 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA
Luciferin-Stammlösung	10 mM Luciferin 10 mM DTT in Glycylglycinpuffer, pH 7.8
Luciferase-Reaktionspuffer	pro Meßansatz 150 µl Glycylglycinpuffer, pH 7.8 30 µl 100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7.8 2 µl 100 mM DTT 2 µl 200 mM ATP
Luciferase-Injektionspuffer	Die Luciferin-Stammlösung 1:5 mit Glycylglycinpuffer verdünnen und DTT in einer Endkonzentration von 8 mM zusetzen
Lyse-Puffer für Hefezellen	10 mM Tris-HCL, pH 8.0 1 mM EDTA 100 mM NaCl 2 % Triton-X-100 1 % SDS
Lyse-Puffer für genom. DNA	50 mM Tris-HCl 100 mM EDTA 0,5% SDS

## II. Material und Methoden

---

Lyse-Puffer für Säugetierzellen	100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7.8 0,2 % Triton X-100 0,5 mM DTT
M2-Medium	5 ml 10 x Hanks 1,25 ml 40 x Hepes 165 µl 300x Na-Pyruvat 0,25 ml 1 M NaOH 0,5 ml Penicillin (6g/l)/Streptomycin (5g/l) 0,2 g BSA 43 ml H <sub>2</sub> O
M16-Medium	1 ml 10 x Earle 270 µl 37,5 x NaHCO <sub>3</sub> 33 µl 300 x Na-Pyruvat 100 µl Penicillin (6g/l)/Streptomycin (5g/l)
Methylenblau-Lösung	0.5 M NaAc (pH 5.2) 0.04% Methylenblau
Mikroinjektionspuffer	10 mM Tris-HCl pH 7.4 0,2 mM EDTA
NaOH/SDS-Lösung	1% SDS 0.2 M NaOH
Neutralisierungslösung	1.5 M NaCl 1 M Tris-HCl (pH 7.0)
PBS-Puffer	130 mM NaCl 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4 mM NaH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS-Proteaseinhibitoren-Lösung	10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Pepstatin A 1 mM EDTA

## II. Material und Methoden

---

PBT-Puffer	0.1% Tween-20 in PBS (1x)
PEG/Lithiumacetat-Lösung	40% PEG-4000 0,1 M Lithiumacetat, pH 7.5 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 1 mM EDTA
RNase A	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O 15 min bei 100°C im Wasserbad
SSC (20 x)	3 M NaCl 0.3 M Tri-Natriumcitrat (pH 7.0 mit NaOH)
Stop-Mix I	95% Formamid 20 mM EDTA 0.05% Bromphenolblau 0.05% Xylencyanol
Stop-Mix II	15% Ficoll 400 200 mM EDTA 0.1% Orange G
TAE-Puffer	200 mM Tris 200 mM Essigsäure 5 mM EDTA (pH 8.0)
TBE-Puffer (5x)	445 mM Tris-HCl (pH 8.0) 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA
TE/Lithiumacetat-Lösung	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 1 mM EDTA 0,1 M Lithiumacetat

## II. Material und Methoden

---

Trypsin/DNase-Lösung	0.25% Trypsin 1 µg/ml DNase I (20 mg/ml) in ERKB-Puffer
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05% Trysin 0,02% EDTA in PBS
Waschlösung I	2 x SSC 0.1% SDS
Waschlösung II	0.2 x SSC
Waschlösung für RZPD-Filter	40 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer, pH 7.2 0,1% SDS
Waschpuffer für GST-Pulldown	50 mM K-Phosphatpuffer, pH 7.5 100 mM KCl
X-Gal-Stammlösung	20 mg X-Gal/ml N, N Dimethyl- formamid
Z-Puffer	16,1 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 5,5 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O 0,75 g/l KCl 0,246 g/l MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O pH 7.0
Z-Puffer/X-Gal-Lösung	100 ml Z-Puffer 0,27 ml β-Mercaptoethanol 1,67 ml X-Gal-Stammlösung



## 5. Medien, Antibiotika und Agarplatten

### 5.1.1 Medien für Bakterien

#### **LB-Medium:**

- 1% Trypton
- 0.5% Hefeextrakt
- 0.5% NaCl
- 1.5% Agar
- pH 7.0

Das LB-Medium wurde mit bidestilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

### 5.1.2 Medien für Hefen

#### **YPD-Medium (Vollmedium):**

- 20 g/l Pepton
- 10 g/l Hefeextrakt
- 30 mg/l Adeninhemisulfat
- 2% Glucose
- 18 g/l Agar (bei festem Nährmedium)
- pH 5.8

#### **SD-Medium (Minimalmedium):**

- 6,7 g/l Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren
- 2% Glucose
- 1fach konzentrierte Mangel-Nährlösung
- 20 g/l Agar (bei festem Nährmedium)
- pH 5.8

(bei Verwendung von Histidin-Selektivmedium zusätzlich 3-Amino-1,2,4-Triazol in einer Endkonzentration von 10 mM)

### **Mangel-Nährlösung (10fach konzentriert):**

In Abhängigkeit vom gewünschten Selektivmedium wurden von den folgenden Komponenten eine oder mehrere weggelassen.

300 mg/l	L-Isoleucin
1500 mg/l	L-Valin
200 mg/l	L-Arginin-HCl
200 mg/l	L-Histidin-HCl-Monohydrat
1000 mg/l	L-Leucin
300 mg/l	L-Lysin-HCl
200 mg/l	L-Methionin
500 mg/l	L-Phenylalanin
2000 mg/l	L-Threonin
200 mg/l	L-Tryptophan
300 mg/l	L-Tyrosin
200 mg/l	Adenin-Hemisulfat
200 mg/l	Uracil

### **5.1.3 Medien für die Zellkultur**

Die zur Kultur von eukaryotischen Zellen verwendeten Medien wurden käuflich erworben (Gibco BRL, Karlsruhe) und vor Gebrauch je nach Kulturbedingungen der Zellen mit fötalem Kälberserum (FKS), Antibiotika (Penicillin/ Streptomycin) und Glutamin versetzt und sterilfiltriert. Für die Zellkultur wurden folgende Medien verwendet:

#### **Säugerzellen-Medium:**

DULBECCO's MEM (DMEM)
100 µg/ml Streptomycin
100 I.E./ ml Penicillin
10% Fetales Kälberserum
2 mM L-Glutamin

Zur Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurde Einfriermedium der Firma Gibco/BRL verwendet.

### 5.2 Antibiotika

Von den Antibiotika Ampicillin und Kanamycin wurden Stammlösungen angesetzt, die steril filtriert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Das jeweils benötigte Antibiotikum wurde erst nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von ungefähr  $55^{\circ}\text{C}$  zugegeben.

	Stammlösung	gelöst in	Endkonzentration
<b>Ampicillin</b>	100 mg/ml	H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
<b>Kanamycin</b>	25 mg/ml	H <sub>2</sub> O	25 µg/ml

### 5.3 IPTG/X-Gal-Platten

Zur Herstellung von IPTG/X-Gal-Platten (Blau-Weiß-Selektion) wurden dem LB-Agar ( $55^{\circ}\text{C}$ ) Ampicillin, IPTG und X-Gal in entsprechenden Konzentrationen zugegeben und in Petrischalen gegossen. Die Platten wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

	Stammlösung	gelöst in	Endkonzentration
<b>X-Gal</b>	2%	N.N.-Dimethylformamid	0.0004%
<b>IPTG</b>	100 mM	H <sub>2</sub> O	1 mM

## 6. Verwendete Bakterien- und Hefestämme, Vektoren, Oligonukleotide, Bibliotheken, Zelllinien, Mäusestämme und Datenbanken

### 6.1 Bakterien- und Hefestämme

Zur Vermehrung der Vektoren bzw. der rekombinanten DNA wurden folgende Wirtsstämme eingesetzt:

<i>E. coli</i> BL-21	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> JM 109	Promega, Wisconsin, USA
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Gibco/ BRL, Karlsruhe
<i>E. coli</i> TOP10'	Invitrogen, Leek, Niederlande
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CG-1945	Clontech, Heidelberg

### 6.2 Vektoren

Lawrist 7	RZPD, Berlin
pBluescript SK (+/-)	Stratagene, La Jolla, USA
pGEM 3zf+	Promega, Wisconsin, USA
pGEM-T	Promega, Wisconsin, USA
pZErO-2	Invitrogen, Leek, Niederlande
pGBT9	Clontech, Heidelberg
pGAD GH	Clontech, Heidelberg
pGAD 10	Clontech, Heidelberg
pM1	Sadowski et al., 1992
pVP-FLAG 5	Tsan et al., 1997
GAL4-LUC	Gerhard Behre, München
pCMV- $\beta$ Gal	Clontech, Heidelberg
pGEX-4T	Amershan, Freiburg
pECFP-C1	Clontech, Heidelberg

### 6.3 Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die für Experimente verwendet wurden, generierten die Firmen NAPS (Göttingen) und ROTH (Karlsruhe) in einer Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l. Die Primersequenzen sind im Anhang dargestellt.

### 6.4 Bibliotheken

Maus Testis cDNA-Bibliothek (MATCHMAKER) (Clontech, Heidelberg):

Vektor: pGAD 10

Maus genomische Bibliothek (RZPD, Berlin):

Vektor: Lawrist 7

Wirtsstamm: *E. coli* DH5 $\alpha$

HeLa S3 cDNA-Bibliothek (Clontech, Heidelberg):

Vektor: pGAD GH

### 6.5 Eukaryotische Zelllinien

RI	Embryonale Stammzellen der Passage 11 Dr. A. Nagi, Toronto, Kanada
F9	Maus-Teratokarzinom-Zelllinie, Sherman et al., 1976, American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
GC-1spg	Maus-Spermatogonien-Zelllinie, Hofmann et al., 1992, ATCC, Rockville, USA
GC-4 spc	Maus-Spermatozyten-Zelllinie, Tascou et al., 2000, Institut für Humangenetik, Göttingen
HeLa	Menschliches Zervixkarzinom, Gey et al., 1952, ATCC, Rockville, USA
NS20Y	Maus-Neuroblastom-Zelllinie, Amano et al., 1972, ATCC, Rockville, USA
NPI	Maus-Nieren-Zelllinie, Dr. Strutz, Universität Göttingen, Abt. Nephrologie
NIH3T3	Embryonale Maus-Fibroblasten, ATCC, Rockville, USA

WMP-1      Maus-Lymphoplastoide-Zelllinie, Zörnig et al., 1995, Prof. Hameister,  
Medizinische Genetik, Ulm

### **6.6 Mäusestämme**

Alle Mäuse wurden entweder über die Firma Charles River (Hannover) bezogen oder stammten aus institutseigenen Beständen. Für die Erzeugung der transgenen Linien wurden Mäuse der Stämme NMRI oder FVB benutzt. Als Ammen-Mütter dienten pseudoträchtige Weibchen des Stammes NMRI. Sterile Männchen für die Bereitstellung von pseudoträchtigen Weibchen wurden durch Vasektomie von Männchen des Stammes NMRI nach den Angaben von Hogan et al. (1994) generiert.

### **6.7 Datenbanken**

Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden mit den Sequenzdatenbanken Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>) mit Hilfe des BLAST-Programms (Altschul et al., 1990) analysiert. Strukturelle- und funktionelle Motive von Proteinen wurden mit dem TMpred-Programm (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:931/seq-search/struc-predict.html>), mit dem PSORT II-Programm (<http://psort.nibb.ac.jp/psort/helpwww2.html>) oder mit dem Prosite-Programm ([http://isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN\\_form.html](http://isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html)) analysiert. Die sogenannte „elektronische PCR“ zum lokalisieren von STS-Markern innerhalb einer DNA Sequenz wurde unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/epcr.cgi> durchgeführt (Schuler et al., 1998).

## **7. Molekularbiologische Methoden**

Alle molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Sambrook et al. (1989) bzw. Ausubel et al. (1992) durchgeführt.

## **7.1 Isolierung von Nukleinsäuren**

### **7.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA** (Sambrook et al., 1989)

1.5 ml pelletierte Bakteriensuspension einer angimpften Übernachtskultur wurden mit 100 µl Lösung I, 200 µl Lösung II und 150 µl Lösung III behandelt. Nach einer Zentrifugation (12 000 x g, 10 min, RT) wurde der Überstand einer Phenol/Chloroform-Extraktion (1xVol.) unterzogen und anschließend mit 1 ml Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **7.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA**

Zur Isolation größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde der JETSTAR Plasmid Midi Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) oder der Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die DNA wird dabei über eine Säule affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Aufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die mit dieser Methode isolierte Plasmid-DNA kann u.a. für die Transfektion von Zelllinien, Restriktionsanalysen, Hybridisierungsexperimente und zur Subklonierung oder Sequenzierung eingesetzt werden.

### **7.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Organen** (Laird et al., 1991)

Die Isolierung genomischer DNA der Maus erfolgte aus der Milz, bzw. bei einer anschließenden Genotypisierung erfolgte die Isolierung aus der Schwanzspitze von Mäusen. Dabei wurden 1–2 cm der Schwanzspitze von etwa 3 Wochen alten Mäusen in 700 µl Lysis-Puffer (II. 4) unter Zugabe von 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 55°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion (1:1) wurde die DNA mit 500 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation (12000 x g, 10 min, RT) präzipitiert. Nach einem Waschschrift mit 500 µl 70% Ethanol wurde das DNA-Pellet in 100–200 µl H<sub>2</sub>O gelöst und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

### 7.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben (Chomczynski et al., 1987)

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben erfolgte mit dem Total-RNA-Isolierungsreagenz (Biomol, Hamburg) nach dem Protokoll des Herstellers. Das Gewebe wurde mit einem Dispergierwerkzeug (Ultraturrax T25, Schütt, Göttingen) homogenisiert. Die Ausbeute betrug 150-500 µg Gesamt-RNA/100 mg Gewebe.

### 7.1.5 Isolierung von PolyA(+) RNA

Zur Anreicherung von messenger RNA (mRNA) wurde der Oligotex-mRNA-Kit (Quiagen, Hilden) benutzt. Gesamt-RNA wurde 1:1 mit 2 x Bindungspuffer gemischt und mit 6 µl Oligotex Suspension/100 µg RNA 3 min bei 65°C denaturiert und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Die Oligotex Partikel wurden abzentrifugiert (14000 x g, 2 min, RT) (Eppendorf-zentrifuge) und zweimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution der mRNA wurde mit zweimal 5 µl Elutionspuffer (vorgewärmt auf 70°C) je 100 µg eingesetzter Gesamt-RNA durchgeführt.

### 7.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Spektralphotometer (Ultrospec 300pro, Amersham, Braunschweig) bestimmt. Nach Abgleichen der Nullwerte konnte das Absorptionsmaximum der gemessenen Nukleinsäuren (bei 260 nm) bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 230 nm) festgelegt werden. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times f \times c$$

$E$  = Extinktion

$f$  = Verdünnungsfaktor

$c$  = nukleinsäurespezifischer Koeffizient in µg/µl

für doppelsträngige DNA:  $c = 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

für einzelsträngige DNA:  $c = 0.025 \mu\text{g}/\mu\text{l}$



für RNA:  $c = 0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte  $2.0 \pm 0.2$  betragen.

## **7.2 Enzymatische Modifikation von DNA: Klonierungstechniken**

### **7.2.1 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA**

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde in einem Volumen von mindestens  $20 \mu\text{l}$  bei der enzymespezifischen Temperatur für 2-15 h durchgeführt, wobei pro  $\mu\text{g}$  DNA 5-10 U des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt wurden.

### **7.2.2 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA**

Um eine Religation von Vektor-DNA, die nur mit einem Enzym geschnitten ist, während einer nachfolgenden Ligation zu verhindern, wurde das Plasmid dephosphoryliert. Dazu wurde nach der Restriktionsspaltung 1 U alkalische Phosphatase direkt zum Verdauungsansatz gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurde die dephosphorylierte DNA durch eine Phenol/Chloroform-Behandlung aufgereinigt und mit 2.5 Vol. Ethanol und 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 4.8) ausgefällt. Anschließend wurde das Pellet in einer Endkonzentration von  $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$  in 1x TE-Puffer aufgenommen.

### **7.2.3 Ligation eines DNA-Inserts in einen Plasmid-Vektor**

Die geschnittenen, isolierten und gegebenenfalls dephosphorylierten DNA-Fragmente konnten direkt in die komplementären Restriktionsschnittstellen des Plasmid-Vektors ligiert werden. Der Ansatz wurde über Nacht bei  $16^\circ\text{C}$  inkubiert.

### Ligationsansatz:

30-120 ng DNA-Insert  
30 ng Vektor-Plasmid-DNA  
1 µl 10 x Ligationspuffer  
1 µl T<sub>4</sub>-DNA-Ligase (5 U/ml)  
ad 10 µl H<sub>2</sub>O

### 7.2.4 Transformation von Bakterien (Hanahan et al., 1985)

Kompetente Bakterien für die Transformation wurden entweder nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode nach Dagert et al. (1979) erstellt oder käuflich erworben (Gibco BRL, Karlsruhe). Für die Transformation der Bakterien mit den Plasmiden ließ man die kompetenten Zellen zunächst langsam auf Eis auftauen. Danach wurde der Ligationsansatz mit 50 µl der kompetenten Bakterien gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock des Ansatzes für 90 sec bei 42°C. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 150-200 µl der transformierten Bakterien auf eine IPTG/X-Gal-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

## 7.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

### 7.3.1 Gelelektrophorese von DNA

Für ein 1.5%iges Agarosegel wurden 1.5 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer (oder 1 x TAE) durch Kochen gelöst, auf 60°C abgekühlt und in die vorgefertigten Gelträger überführt. Vorher wurde der Agaroselösung 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt, ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen flaches, mehrgliedriges Ringsystem zwischen benachbarten Basenpaaren interkaliert und so eine Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht ermöglicht. Nach vollständiger Verfestigung des Gels wurde die Elektrophorese in einer mit 1 x TBE-Puffer gefüllten Gelkammer bei konstanter Voltzahl (6-8 V/cm) durchgeführt.

### 7.3.2 Gelelektrophorese von RNA

Um die Rückbildung der Sekundärstruktur der RNA während der Gelelektrophorese zu verhindern, wurde dem 1%-igen Agarosegel (gelöst in 1 x MOPS) eine Formaldehyd-Lösung zugesetzt (Endkonzentration: 6.6%). Die RNA-Proben mussten vor der Auftrennung folgendermaßen behandelt werden:

- x µl RNA (20 µg Gesamt-RNA, bzw. bis 1 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA)
- 2 µl 10 x MOPS
- 8 µl deionisiertes Formamid
- 3 µl Formaldehyd (37%-ige Lösung)
- 20 µl Gesamtansatz

Dieses Gemisch wurde dann bei 55°C für 10 min denaturiert und für 5 min auf Eis gestellt. Die RNA-Proben wurden mit 0.2 Vol. Stop-Mix I versetzt und mit 60 Volt bei 4°C gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 7.3.3 Längenstandards

Um die Größe der DNA-Fragmente bei der Gelelektrophorese bestimmen zu können, wurde parallel zu den DNA-Proben der "1 kb DNA Ladder"-Längenstandard (Gibco BRL, Karlsruhe) auf das Elektrophoresegel aufgetragen. Bei der Auftrennung von RNA wurde analog ein RNA-Längenstandard aufgetragen (RNA Ladder, Gibco BRL).

### 7.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem Jet-Sorb-Kit (Genomed, Bad Oeyenhausen) nach dem Protokoll des Herstellers. Die typische Ausbeute an DNA-Fragmenten >400 bp lag bei ca. 70-80% (<400 bp, ca. 50%).

## **7.4 Transfertechniken von Nukleinsäuren**

### **7.4.1 Transfer von DNA-Fragmenten: Southern-Blotting** (Southern, 1975)

Mit Hilfe des Southern-Transfers wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen auf Nitrocellulose- oder Nylonmembranen übertragen. Nach einer Elektrophorese wurde das Gel für 2 x 30 min in Denaturierungslösung überführt und abschließend für 2 x 30 min in Neutralisierungslösung behandelt. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte mit der Turbo-Blot-Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) nach dem Protokoll des Herstellers. Am nächsten Morgen wurde die Position der Geltaschen auf der Membran markiert. Der Filter wurde vom Gel abgenommen und zur Fixierung der DNA für 2 h bei 80°C gebacken.

### **7.4.2 Transfer von RNA aus Agarosegelen (Northern-Blotting)**

Die RNA aus dem denaturierenden RNA-Gel wurde direkt nach der Elektrophorese auf einen Nitrocellulosefilter transferiert. Nach dem Transfer wurde die RNA in gleicher Weise wie die DNA an die Membran fixiert. RNA-Längenstandard enthaltende Spuren wurden vom Filter abgeschnitten und für 15 min in 5%iger Essigsäure auf der Membran fixiert und 10 min in Färbelösung (Methylenblau 0.04%, 0.5 M NaAc, pH 5.2) angefärbt. Der Längenstandard wurde unter fließendem Wasser entfärbt und luftgetrocknet.

## **7.5 Radioaktive Markierung von DNA und Hybridisierung**

### **7.5.1 "random priming"** (Feinberg und Vogelstein et al., 1983)

Die Markierung von DNA-Sonden erfolgte nach der Methode des "random priming" mit dem Ready Prime Kit II (Amersham, Braunschweig) nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Aufreinigung der Sonde von freien nichtgebundenen Nukleotiden wurde der Gesamtansatz von 55 µl auf eine MicroSin<sup>TM</sup>-Säule (Amersham, Braunschweig) gegeben und bei 735 x g für 1 min zentrifugiert. Die spezifische Aktivität der DNA-Probe wurde im Szintillationszähler

(Tri-Carb 4530, Packard Instruments, Warrenville, USA) gemessen. Sie liegt in der Regel zwischen  $4 \times 10^8$  und  $5 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g DNA.

### **7.5.2 Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundene DNA oder RNA**

Die gebackenen Nitrocellulosefilter mit der gebundenen DNA bzw. RNA wurden für mindestens 2 h in Hybridisierungslösung im Rollerofen (Bachofer, Reutlingen) prähybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur wurde zwischen 58-68°C gewählt. Nach Zugabe der denaturierten Sonde sowie 300  $\mu$ l Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) zur Hybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung über Nacht im Rollerofen. Die Filter wurden bei einer Temperatur von 55°–65°C gewaschen. Je nach gewünschter Stringenz wurde unterschiedlich lange in Waschlösung I bzw. Waschlösung II gewaschen. Die Filter wurden in Folie eingeschweißt und die Exposition der Filter erfolgte mit einem Röntgenfilm in einer Autoradiographie-Kassette bei –70°C.

### **7.5.3 Hybridisierung von RZPD-Filtern**

Von der RZPD (Ressourcen-Zentrum/Primär-Datenbank im Deutschen Humangenomprojekt, Max Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin) wurden Filter bezogen, auf denen die DNA von cDNA- oder genomischen Klonen gespottet ist. Die Filter wurden gemäß dem Protokoll der RZPD mit einer spezifischen radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Die Exposition der Filter erfolgte mit einem Röntgenfilm in einer Autoradiographie-Kassette bei –70°C. Potentiell positive Klone wurden berechnet und bei der RZPD zur weiteren Analyse bestellt.

## 7.6 Methoden der "Polymerase Chain Reaction" (PCR) (Saiki et al., 1985)

### 7.6.1 PCR an Plasmid-DNA

Die Methode wurde nach folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

x µl	Template-DNA (30–500 ng)
1 µl	Primer 1 (10 pmol/µl, sequenzspezifisch)
1 µl	Primer 2 (10 pmol/µl, sequenzspezifisch)
1 µl	dNTPs (10 mM)
5 µl	Taq-Polymerase Puffer (10x)
0.5 µl	Platinum Taq-Polymerase (2.5 U/µl) (Gibco BRL)
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Der Ansatz wurde für 30-40 Zyklen der DNA-Amplifikation in einem Thermocycler (MWG Biotech Primus96) unterworfen. Die Anzahl der Zyklen, die einzelnen Temperaturschritte und die jeweilige Dauer der Zyklen musste für jedes DNA-Fragment und die dafür eingesetzten Primer neu gewählt werden. Der Reaktionsansatz wurde folgendem Programm im Thermocycler unterworfen:

95°C	30–60 sec	Denaturierung
50–65°C	30–90 sec	Annealing
72°C	30–90 sec	Elongation

Vor Beginn des ersten Zyklus wurde 3–5 min bei 95°C denaturiert. Nach Beendigung der gewünschten Zyklen schloss sich ein letzter Elongationsschritt von 7 min bei 72°C an. 1/10 des Ansatzes wurden mit Stopmix II gemischt und je nach Größe des PCR-Produkts auf ein 1-1.5%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

### 7.6.2 PCR an genomischer DNA

Zur Amplifikation spezifischer Sequenzen von genomischer DNA wurde die DNA wie unter II.7.1.3 beschrieben extrahiert und mit folgenden Substanzen zu einem Reaktionsansatz zusammenpipettiert:

x µl DNA (300-500 ng)  
1 µl Primer 1 (10 pmol/µl)  
1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)  
1 µl dNTPs (10 mM)  
5 µl Taq-Polymerase Puffer (10x)  
0.5 µl Platinum Taq-Polymerase (2.5 U/µl) (Gibco BRL)  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

### 7.6.3 "Reverse-Transkriptase PCR" (RT-PCR) (Kogan et al., 1987)

Die Methode der reversen PCR basiert auf der Umschreibung von mRNA in cDNA und auf einer anschließenden PCR. Mit Hilfe der RT-PCR können kleinste Transkriptmengen in Geweben detektiert werden. 10 µg Gesamt-RNA (II. 7.1.4) wurden mit 30 U DNase I (RNase-frei) 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit einer anschließenden Präzipitation der RNA mit 2.5 Vol. Ethanol und 1/10 Vol. 3M NaAc, pH 5,2. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde das Pellet in 10 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Für die cDNA-Synthese wurden 10 pmol eines sequenzspezifischen Reverse-Primers oder 500 ng eines Oligo-dT-Primers zu 1-5 µg Gesamt-RNA (oder 50-500 ng mRNA) gegeben und auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 10 min bei 70°C denaturiert und 2 min auf Eis inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden folgende Komponenten beigefügt:

12 µl Ansatz (RNA und Primer)  
4 µl 5 x Reverse Transkriptase-Puffer  
2 µl DTT (0.1 M)  
1 µl dNTPs (10 mM)

1  $\mu$ l Reverse Transkriptase (Superscript, 200 U)  
ad 20  $\mu$ l Gesamtansatz

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 42°C inkubiert. Nach der cDNA Synthese wurde ein 2  $\mu$ l-Aliquot in eine PCR eingesetzt. Die Konzentration der Primer, des Puffers und des Enzyms entsprachen den unter II.7.6.2 gemachten Angaben. Das PCR-Produkt wurde subkloniert und sequenziert.

### 7.7 Sequenzierungsanalyse (Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierung wurde modifiziert nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Prinzip der durch den Einbau von Didesoxynukleotiden statistisch unterbrochenen DNA-Neusynthese. Für die Sequenzierungs-PCR wurde die Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin-Elmer) Methode angewendet. Dazu wurde das Protokoll des BigDyeTerminator Kits (ABI) befolgt. 0.5–1  $\mu$ g Plasmid-DNA wurden jeweils für die Sequenzierungs-PCR eingesetzt. Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR in einem Thermocycler (MWG Biotech Primus 96) durchgeführt. Nach Denaturierung bei 95°C wurden die Proben für 25 Zyclen folgendem Programm unterzogen:

98°C	30 sec	Denaturierung
50°C	15 sec	Annealing
60°C	4 min	Elongation

Nach der PCR wurde die DNA mit 2.5 x Vol. Ethanol und 1/10 Vol. NaAc gefällt und erneut mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde abschließend in 5  $\mu$ l Formamid-Mix (50 mM EDTA, pH 8.0; mit Formamid im Verhältnis 5:1) aufgenommen und auf ein 6.8%iges Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetragen. Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten Sequenzierung erfolgte mit einem automatischen Sequenzier Modell 373A (Applied Biosystem) unter Verwendung des Mac Molly Tetra Software Packets (Softgene, Berlin).



### 7.8 Subtraktive Hybridisierung (SH) (Diatchenko et al., 1996)

Die Methode der subtraktiven Hybridisierung (SH) wurde verwendet, um differentiell exprimierte cDNAs von zwei verschiedenen mRNA-Populationen zu isolieren. Die cDNA-Bibliothek, die differentiell exprimierte Transkripte enthält wird als „tester“ klassifiziert und die cDNA-Bibliothek, die als Referenz gilt, wird als „driver“ klassifiziert. Die Methode wurde mit dem cDNA-Subtractions Kit (Clontech, Heidelberg) durchgeführt. Zwei µg der „tester“ mRNAs und der „driver“ mRNAs wurden jeweils in einer Reversen-Transkriptase-Reaktion in cDNAs umgeschrieben, dies erfolgte bei 42°C in einem Thermocycler (MWG Biotech Primus 96) für 1.5 h.

Reaktionsansatz:

- 2 µg mRNA
- 1 µl Primer (10 µM)
- 2 µl Reaktionspuffer (5x)
- 1 µl dNTP mix (10 mM)
- 1 µl Reverse Transcriptase (200 U)
- ad 10 µl H<sub>2</sub>O

Beide synthetisierten cDNAs wurden unmittelbar danach einer Zweitstrangsynthese unterworfen.

Reaktionsansatz:

- 16 µl Zweit-Strang-Puffer
- 1,6 µl dNTP mix (10 mM)
- 4 µl Enzym-Cocktail
- 10 µl cDNA
- 48,4 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde zunächst bei 16°C für 2 h inkubiert. Danach wurden 2 µl (6 U) T4 DNA Polymerase (Clontech) dazugegeben und für 30 min bei 30°C in einem Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden die „tester-“ und die „driver“ cDNAs mit dem Enzym *RsaI* (15 U) 1.5 h bei 37°C verdaut. Es erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit einer anschließenden Fällung der DNA mit 2.5 Vol. Ethanol und 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 5.2. Die

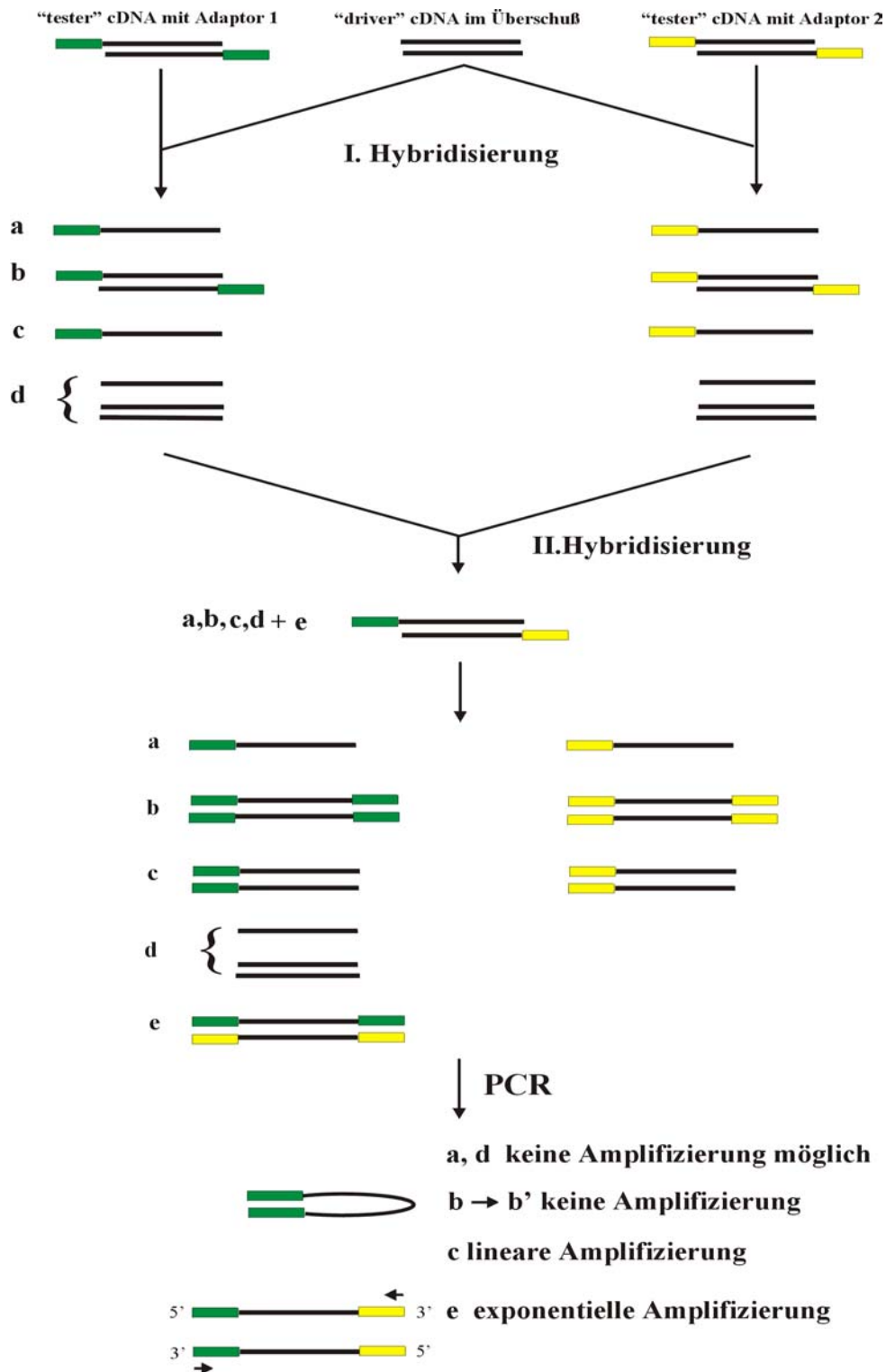
„tester“ cDNA wurde in zwei Gruppen eingeteilt (tester 1 und tester 2) und jede Gruppe wurde mit einem individuellen spezifischen Adaptor (A1 und A2) mit einer T4 DNA Ligase (400 U) bei 16°C über Nacht ligiert. Den Adaptoren fehlte jeweils am 3'-Ende eine Phosphatgruppe, so dass eine Ligation nur am 5'-Ende der jeweiligen cDNA erfolgte.

In einem 0.5 µl-PCR Reaktionsgefäß wurden, nach einem Denaturierungsschritt bei 98°C für 1.5 min, „driver“- und „tester“ cDNA miteinander bei 68°C für 8 h inkubiert. Die „driver“ cDNA lag dabei im 2-3 fachen Überschuss vor, um eine spätere exponentielle Amplifizierung differentiell exprimierter cDNAs zu ermöglichen. In einer zweiten Hybridisierung wurden beide „tester-Ansätze“, die sich nur durch einen unterschiedlichen Adaptor unterschieden, erneut bei 68°C für 8 h inkubiert, ohne jedoch erneut zu denaturieren. Dies ermöglichte die Bildung von Hybriden komplementärer „tester-cDNA-Stränge“, die differentiell exprimiert sind (Abb. 2). In einer anschließenden PCR-Reaktion wurden diese Hybride exponentiell amplifiziert, dabei wurden Primer verwendet, die spezifisch an die Adaptor-Sequenzen binden (PCR Primer 1 und PCR Primer 2).

Reaktionsbedingungen:

94°C	30 sec	} 27 Zyklen
68°C	30 sec	
72°C	1,5 min	

Ein µl des Reaktionsansatzes wurde für eine zweite PCR-Reaktion („nested-PCR“) verwendet. Dabei wurden zwei sogenannte „nested“ Primer verwendet (nested PCR Primer 1 und nested PCR Primer 2), deren Bindungstellen sich ca. 20 bp weiter zum jeweiligen 3'-Ende befinden. Die „nested“ PCR wurde durchgeführt, um die Produktmenge zu erhöhen und um eine erhöhte Spezifität der amplifizierten Produkte zu erreichen. Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisiert. Die amplifizierten Fragmente wurden in den pGEM-T Vektor (Promega, Madison, WI) subkloniert und sequenziert. Eine differentielle Genexpression der isolierten Klone wurde anhand von Northern Blot-Analysen verifiziert.



**Abb. 2** Schematische Darstellung der Methode der subtraktiven Hybridisierung. Die Konfiguration e entspricht der Bildung von Hybriden komplementärer „tester-cDNA-Stränge“, die differentiell in den beiden mRNA Populationen exprimiert werden. In der abschließenden PCR-Reaktion wird ausschließlich die Konfiguration e exponentiell amplifiziert. Die grünen und gelben Boxen entsprechen dem verwendeten Adaptor 1 bzw. Adaptor 2.

## 7.9 Chromosomale Lokalisation mittels Fluoreszenz-*in situ*

### Hybridisierung (FISH) (Koehler et al., 1996 )

Eine chromosomale Lokalisation erfolgte über Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH). Dabei wurde genomische DNA eines Maus Cosmidklons als Sonde eingesetzt und *in situ* an Metaphasechromosomen der WMP-1 Zelllinie hybridisiert (Zörnig et al., 1995). Die Sonde wurde über Nicktranslation mit Biotin-16-dUTP (Boehringer, Mannheim) markiert. Zu 400 ng der markierten Sonde wurden 10 µg Lachsspermien DNA (zur Absättigung von unspezifischen Sequenzen) und 4 µg Cot1-DNA (zur Absättigung von hochrepetitiven Sequenzen) zugegeben. Nach der Denaturierung der Sonde wurde diese 15 min bei 37°C inkubiert (Preannealing) und auf die denaturierten Chromosomenpräparate gegeben. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 37°C in einer feuchten Kammer. Die Detektion der gebundenen Sonde erfolgte über eine Antikörper-Reaktion mit FITC-Avidin Lösung und einem biotinilierten Anti-Avidin-Antikörper (Pinkel et al., 1986). Im Anschluss an den Immunfluoreszenz-Nachweis wurden die Chromosomenpräparate mit Propidiumjodid (PI) und 4'-6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt. Die Auswertung der Chromosomenpräparate erfolgte mit einem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit Filterradkombination.

## 8. Proteinbiochemische Techniken

### 8.1 Isolierung von Gesamtproteinen aus Gewebe

Frisches Gewebe wurde in ein 15 bzw. 50 ml Falcon-Gefäß mit 1 Vol. SEM-Puffer gegeben. Das Gewebe wurde mit einem Dispergierwerkzeug (Ultraturrax T25, Schütt, Göttingen) homogenisiert, und die groben Gewebetrümmer wurden abzentrifugiert (4000 x g, 10 min, 4°C). Der Proteinüberstand wurde nach Zugabe von 1 Vol. 2 x SDS-Auftragspuffer zur Denaturierung 10 min im Wasserbad gekocht und danach auf Eis abgekühlt. 10 µl des Ansatzes wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

### **8.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen** (Bradford et al., 1976)

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford et al. mit Hilfe des Biorad Protein Assays (Biorad Laboratories, München) bestimmt. Der im Kit enthaltene Farbstoff ändert sein Absorptionsverhalten bei 595 nm linear zur Proteinkonzentration im Reaktionsansatz. Durch Mitführen einer BSA-Eichreihe (0-6.7 µg BSA/ml) als internen Standard kann die Proteinkonzentration aus der Eichgeraden extrapoliert werden. Der Biorad-Farbstoff wurde 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und im Verhältnis 15:1 (280 µl + 20 µl) mit Proteinlösung vermischt. Die Messung der Extinktion erfolgte in flachbödigen 96 Loch-Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen), die in einem „Microplate Reader 450“ (Biorad Laboratories, München) bei 595 nm ausgewertet wurden. Es wurden je Probe drei Messungen durchgeführt und die Werte gemittelt.

### **8.3 SDS-Polyacrylamidgel**

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurden Gele mit 6-10% Polyacrylamidgehalt verwendet. Bei der SDS-PAGE erfolgt die Auftrennung der Proteine im wesentlichen aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte. Zur Herstellung der SDS-Page-Gele wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Lösungen für das Trenngel zusammenpipettiert, kurz gemischt, entgast und zwischen die gesäuberten Glasplatten gefüllt. Das Trenngel wurde mit wenig Butanol überschichtet und mindestens 1 h polymerisiert. Anschließend wurde das Butanol abgeschüttelt. Die Lösungen für das Sammelgel wurden zusammenpipettiert, entgast und auf das Trenngel geschichtet. Der Gelkamm wurde luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurden die Gele an die Elektrophoresekammer angeklammert und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Elektrophorese der Proben erfolgte mit 10-15 mA über Nacht.

### Herstellung der Gelösungen:

#### Trenngel (30 ml)

Acrylamidkonzentration	6%	10%	12%	15%
H <sub>2</sub> O	13.9 ml	11.9 ml	9.9 ml	6.9 ml
Acrylamidlösung (30%)	8.0 ml	10.0 ml	12.0 ml	15.0 ml
Lower-Tris (4x)	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
10% APS	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml
TEMED	18 µl	12 µl	12 µl	12 µl

#### Sammelgel (10 ml)

H <sub>2</sub> O	6.8 ml
Acrylamidlösung (30%)	1.7 ml
Upper-Tris (4x)	1.25 ml
10% APS	0.1 ml
TEMED	10 µl

### 8.4 Transfer von Proteinen mittels "Semi dry blot"

Proteine wurden standardmäßig nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine PVDF-Membran (Boehringer, Mannheim) transferiert. Hierzu wurden 6 Filterpapiere sowie ein PVDF-Filter in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Für den „semi dry blot“ wurden die Graphitplatten der Transferapparatur mit H<sub>2</sub>O abgerieben. Drei Filterpapiere wurden in Transferpuffer (0.3 M Tris/HCl, pH 8.3, 0.2 M Glycin und 20% Methanol) getränkt und luftblasenfrei auf die Anodenplatte aufgelegt. Die PVDF-Membran wurde in Methanol angefeuchtet, kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und ebenso in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde die Membran auf die Filterpapiere gelegt. Das Gel wurde von den Glasplatten gelöst, das Sammelgel wurde abgetrennt und verworfen, während das Trenngel vorsichtig auf die Membran aufgebracht wurde. Wiederum wurden 3 Filterpapiere in Transferpuffer getaucht und auf die Membran gelegt. Nachdem die Kathodenplatte aufgebracht worden war, erfolgte der Transfer für 1 h bei 0.8 mA/cm<sup>2</sup>. Nach dem Transfer wurde die Membran mit einem monospezifischen Antikörper bzw. polyklonalen Antiserum umgesetzt.

## 8.5 Färbung von Polyacrylamidgelen

SDS-Gele wurden standardmäßig mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel ca. 30 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend für mehrere Stunden in Entfärberlösung gelegt, wobei der Entfärber mehrmals gewechselt wurde.

<b>Färbelösung:</b>	45% Methanol
	9% Essigsäure
	0.05% Coomassie Brilliant Blue R250
<b>Entfärberlösung:</b>	5% Methanol
	7.5% Essigsäure

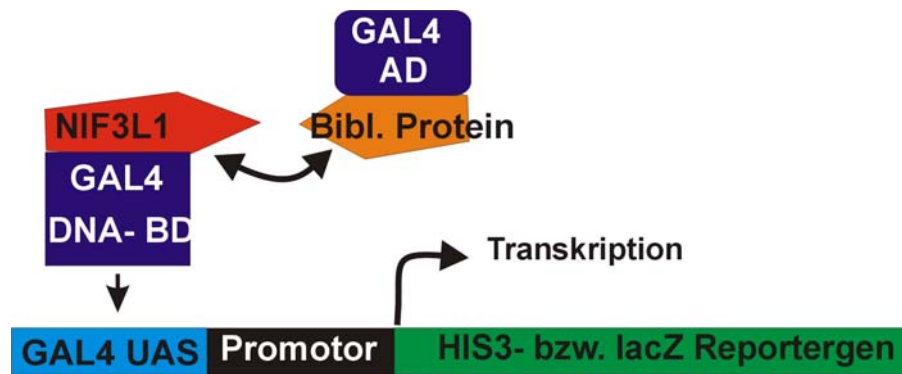
## 8.6 Immunumsetzung von Proteinmembranen

Die Detektion der membrangebunden Proteine erfolgte mit dem BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Boehringer, Mannheim). Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden zunächst vor der Umsetzung mit dem Antiserum 1 h mit 1%iger Blockierungslösung abgesättigt. Danach wurde die Proteinmembran in einer Plastiktüte mit 125  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Antiserum (1:500 in Waschpuffer verdünnt) entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit TBST-Puffer (125  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) für jeweils 10 min und durch zweimaliges Waschen mit 0.5%iger Blockierungslösung für 10 min entfernt. Der mit Peroxidase (POD) gekoppelte Zweitantikörper wurde 1:10000 in 0.5%iger Blockierungslösung verdünnt. Die Membran wurde für 30 min in Antikörperlösung geschwenkt, danach wurde 4 x mit TBST-Puffer (125  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) für jeweils 15 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt und den Chemilumineszenzreagenzien ausgesetzt (20  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). Unmittelbar danach wurde die Membran einem Röntgenfilm (Eastmen Kodak) zur Exposition ausgesetzt.

### 8.7 Yeast –Two-Hybrid-Screening (Fields und Song et al., 1989)

Das Yeast-Two Hybrid-System wurde zur *in vivo* Identifizierung von Interaktionspartnern des NIF3L1-Proteins angewendet. Es basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei funktionell unabhängigen Domänen bestehen. So enthält der GAL4-Transkriptionsaktivator der Hefe eine DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und eine transkriptionsaktivierende Domäne (AD). Die DNA-BD erkennt und bindet an eine als UAS („upstream activating sequence“) bezeichnete Sequenz stromaufwärts von GAL4-responsiven Domänen, während die AD mit anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie interagiert, die an der Initiation der Transkription beteiligt sind. Beide Domänen, die im Normalfall Teile eines einzigen Proteins sind, werden gleichermaßen zur Aktivierung eines Gens benötigt. Werden beide jedoch in derselben Wirtszelle infolge einer Manipulation getrennt exprimiert, kommt es zu keiner direkten Interaktion von DNA-BD und AD und somit auch zu keiner Aktivierung GAL4-responsiver Gene. Im Yeast-Two-Hybrid-System wurden zwei verschiedene Klonierungsvektoren benutzt, um getrennte Fusionen dieser beiden GAL4-Domänen mit (Teilen von) Proteinen zu konstruieren, die auf eine Interaktion hin untersucht werden sollten. Dabei wurde das Köder („Bait“-)Protein NIF3L1 durch Integration der entsprechenden Gensequenz in den Vektor pGBT9 mit der GAL4-DNA-BD fusioniert. Die verwendete HeLa-cDNA-Bibliothek (Clontech, Heidelberg) war in den Vektor pGADGH eingebaut, um Fusionen von Proteinen, für die die cDNAs kodieren, mit der GAL4-AD zu erhalten. Beide Plasmide wurden in den Hefestamm CG-1945 transformiert, in dem die Fusionsproteine exprimiert und in den Zellkern transportiert werden. Im Fall einer Interaktion von NIF3L1 mit einem in der cDNA-Bibliothek kodierten Protein kommt es zu einer Verbindung zwischen GAL4-DNA-BD und GAL4-AD und damit zu einer funktionellen Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsaktivators. Dieser ist daraufhin in der Lage, die Transkription von Reportergenen (*lacZ* und *HIS3*), die stromabwärts der GAL4-Bindungsstellen lokalisiert sind, zu aktivieren, was die Proteininteraktion phänotypisch detektierbar macht (Abb. 3).





**Abb. 3** Schematischer Ablauf des Yeast-Two-Hybrid-Systems. Die Interaktion zwischen NIF3L1 und einem Protein der Bibliothek rekonstituiert den GAL4-Transkriptionsaktivator, was zur Expression der Reportergene *HIS3* und *lacZ* führt.

### 8.7.1 Beschreibung der eingesetzten Materialien

#### **Köder („Bait“)-Protein:**

Der komplette offene Leserahmen des humanen NIF3L1-Proteins wurde unter Beibehaltung des Leserahmens als Fusionskonstrukt an den C-Terminus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne in den pGBT9-Vektor kloniert (Tab.1).

#### **cDNA-Bibliothek:**

Die Quelle der cDNA-Bibliothek war die mRNA einer exponentiell wachsenden HeLa-S3-Zelllinie, die mittels eines *XhoI* (dT)<sub>15</sub>-Primers in die entsprechenden cDNAs umgeschrieben worden war. Die cDNAs waren unidirektional über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pGAD GH kloniert worden (Tab. 1) und besaßen eine Größe von 0.4- 2.0 kb (Ø 1.5 kb). Die Anzahl unabhängiger Klone betrug  $7 \times 10^6$ . Die HeLaS3 cDNA-Bibliothek (Clontech, Heidelberg) wurde freundlicherweise von PD. Dr. Bohlander zur Verfügung gestellt.

#### **Hefe-Stamm CG-1945:**

Die Plasmide pGBT9-NIF3L1 und pGADGH-cDNA-Bibliothek wurden seriell in den Hefestamm CG-1945 transformiert. Der Hefestamm CG-1945 trägt sowohl das *lacZ* als auch das *HIS3* als Reportergene (Tab. 2).

Plasmid	Genetische Charakterisierung	Referenz
pGBT9	Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Aminosäuren 1-147), <i>Trp1</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	Bartel et al., 1993
pGAD GH	GAL4-Aktivierungsdomäne (Aminosäuren 768-881), <i>Leu2</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	Bartel et al., 1993

**Tab. 1** Darstellung der verwendeten Plasmide

Stamm	Genotyp	Reportergene	Transformationsmarker	Referenz
CG-1945	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp 1-901</i> , <i>ade2-101</i> , <i>leu 2-3</i> , <i>gal4-452</i> , <i>gal80-538</i> , <i>URA3::(GAL4 17 mere)<sub>3</sub>-CYC1-lacZ</i>	<i>HIS3</i> , <i>lacZ</i>	<i>trp1</i> , <i>leu2</i>	Bartel et al., 1993

**Tab. 2** Genotyp des Hefestammes CG-1945

### 8.7.2 Transformation von pGBT9-NIF3L1 im kleinen Ansatz

Es wurden 300 ml YPD- Nährlösung mit 25 ml einer Übernachtskultur von CG-1945 beimpft und 3h bei 30°C inkubiert, wodurch eine OD<sub>600</sub> von 1.8 erzielt wurde. Nach Zellernte und Waschen mit sterilem Wasser wurde das Pellet in 1.5 ml TE/Lithiumacetat-Lösung suspendiert, um kompetente Zellen zu generieren. Das für die Transformation verfügbare Volumen belief sich auf 2.8 ml. 100 µl dieser Suspension wurden mit 1 µg Plasmid DNA des Konstruktes pGBT9-NIF3L1 und 100 µg Lachsspermien-DNA (10µg/µl) vermischt. Nach Zusatz von 600 µl PEG/Lithiumacetat-Lösung wurde der Ansatz 30 min bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden 70 µl DMSO zugefügt und die Zellen 15 min lang einem 42°C- Hitzeschock ausgesetzt. Die so behandelten Zellen wurden auf Eis abgekühlt, pelletiert und in 0.5

ml TE-Puffer suspendiert. Von dieser Suspension wurden 100 µl auf einem SD/-Trp- Selektivnährboden ausgestrichen und bei 30°C für 3-4 Tage inkubiert.

### **8.7.3 Transformation von pGADGH/ cDNA-Bibliothek im großen Ansatz**

Die auf dem SD/-Trp-Nährboden herangewachsenen transformierten Hefezellen (CG-1945-pGBT9-NIF3L1) wurden in der gleichen Weise behandelt wie im II.8.7.2 beschriebenen kleinen Ansatz, jedoch ist hier für die Transformation der cDNA-Bibliothek das präparierte Volumen an Zellsuspension (2.8 ml) komplett verwendet worden. Es wurden 50 µg Plasmid – DNA eingesetzt, da bei diesem Verhältnis von Zellen zu transformierter DNA-Menge die Transformationseffizienz in Vorversuchen einen Maximalwert von  $1 \times 10^4$  Transformanten/µg DNA erreicht hatte. Analog sind die Mengen den übrigen Komponenten des Transformationsansatzes erhöht worden. Nach der Transformation wurden die Zellen zunächst 1h bei 30°C in 14 ml YPD-Nährlösung inkubiert, bevor sie in Volumenanteilen von 300 µl auf 28 SD/Trp-Leu-His-Selektivnährböden ausgestrichen und bei 30°C inkubiert worden. Zur Kontrolle wurden jeweils 3 µl der Transformationsmischung auf SD/-Leu und auf SD/-Leu-Trp-Selektivnährböden ausgestrichen.

### **8.7.4 Selektion relevanter Transformanten**

Durch die Selektion sollten Transformanten ausfindig gemacht werden, in denen das DNA-BD/NIF3L1-Fusionsprotein mit einem AD-Fusionsprotein der Bibliothek interagiert. Da der verwendete Hefestamm CG-1945 zwei Reportergene (HIS3 und lacZ) besitzt, die beide unter der Kontrolle des GAL4-Transkriptionsaktivators stehen, jedoch verschiedene Promotoren haben, ist eine Doppelselektion der erhaltenen Cotransformanten möglich. Die Selektion HIS3-exprimierender Zellen ist durch ihre Fähigkeit zum Wachstum auf SD/-Leu-Trp-His-Nährboden erfolgt. Die hier erhaltenen Kolonien wurden darüber hinaus auf die Expression des lacZ-Gens bzw. auf die Aktivität der β-Galactosidase getestet. Dazu wurden die Kolonien mit einem sterilen Filterpapier von der Nährbodenplatte abgehoben und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die so behandelten Zellen wurden auf einen zweiten Filter gelegt, der mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung

getränkt war. Sofern das (künstliche) Substrat X-Gal durch die  $\beta$ -Galactosidase umgesetzt wurde, zeigten die entsprechenden Kolonien nach einigen Stunden eine Blaufärbung.

### **8.7.5 Verifikation positiver Klone durch Erzeugung von Segreganten**

Da in einigen bei der Doppelsektion erhaltenen putativ positiven Klonen die Aktivierung der Reportergene nicht auf einer Interaktion der beiden Fusionsproteine beruht, sondern allein durch das AD- Fusionsprotein hervorgerufen wird, wurden durch Elimination des DNA-BD-Plasmids (pGBT9-NIF3L1) Klone erzeugt, die nur noch das AD-Plasmid (pGADGH/cDNA-Klon) trugen. Dies wurde erreicht, indem die Klone zunächst einen Tag in SD-Leu-Nährlösung angezogen und anschließend (in einer  $10^{-4}$ -Verdünnung) auf SD/-Leu und zur Kontrolle auch auf SD/-Leu-Trp- Nährboden ausgestrichen wurden. Um Segreganten zu identifizieren, wurden daraufhin einzelne Kolonien vom SD/-Leu-Nährboden auf markierte Bereiche eines frischen SD/-Leu- und eines SD/-Leu-Trp-Nährbodens übertragen. Klone, die nur auf dem SD/-Leu-Nährboden heranwuchsen, enthielten lediglich das AD-Plasmid. Diese Klone wurden dann auf SD-Leu-His-Selektivnährböden ausgestrichen. Bei positiven Kandidaten durfte kein Wachstum auf diesen Platten erfolgen.

### **8.7.6 Isolierung des AD-Plasmids aus Hefezellen und Klon-Analyse**

Nachdem die Interaktion eines AD-Fusionsproteins mit NIF3L1 durch die oben beschriebenen Verfahren bestätigt worden war, wurde das entsprechende AD-Plasmid (pGAD GH) aus den Hefezellen isoliert. Dafür wurden die hergestellten Segreganten (II. 8.7.5) herangezogen. Zwei ml SD-Leu-Selektivnährmedium wurden mit einer entsprechenden Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und intensivem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1.5 ml in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und für 5 sec bei 12000 x g bei RT zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 200  $\mu$ l Lyse-Puffer für Hefen resuspendiert. Anschließend wurden 200  $\mu$ l Phenol/Chloroform (1:1) sowie 0.3 g Glasperlen (Sigma) hinzugegeben und 2 min intensiv gevortext. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert (5 min, 12 000 x g, RT) und mit 2.5 Vol. Ethanol und 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 5.2

5.2 gefällt, in 70%igen Ethanol gewaschen und in 50 µl H<sub>2</sub>O suspendiert. Anschließend wurde die isolierte Plasmid-DNA als Template in einer PCR Reaktion verwendet, unter Verwendung von zwei flankierenden vektorspezifischen Primern (Y2H2 und Y2HAD3). Das Amplifikat wurde in den pGEM-T-Vektor (Promega) inkloniert. Nach einer Mini-Präparation sind die darin enthaltenen cDNA-Klone in beide Richtungen mit den plasmidspezifischen Primern SP6 und T7 sequenziert und anschließend mit dem BLAST-Programm (Altschul et al., 1990) analysiert worden.

### **8.8 GST-Pulldown (Smith und Johnson et al., 1988)**

Ein GST-Pulldown wurde durchgeführt, um die im Yeast-Two-Hybrid-Screening gefundenen Proteininteraktionen mit einer zweiten unabhängigen Methode zu verifizieren. In dem Verfahren wurde das Köder („Bait“)-Protein NIF3L1 mit einem Lysat von Kaninchen-Retikulozyten *in vitro* exprimiert und gleichzeitig über die Aminosäure Methionin radioaktiv markiert. Die cDNA-Klone der mutmaßlich interagierenden Proteine wurden in pGEX-4T Vektoren (Amersham, Braunschweig) integriert, die ihre induzierte Expression in Bakterien als Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (GST) ermöglichen. Diese GST-Fusionsproteine wurden affinitätschromatographisch aus dem bakteriellen Lysat aufgereinigt, wobei eine Sepharose-Matrix benutzt wurde, die mit Glutathion, dem Substrat der GST, gekoppelt war. NIF3L1 und die aufgereinigten Fusionsproteine wurden anschließend *in vitro* inkubiert.

#### **8.8.1 Radioaktive *in vitro* Translation des Zielproteins**

Die *in vitro* Translation wurde mit Hilfe des TNT-Retikulozytenlysats (Promega, Madison, WI), einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem, ausgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Nukleotidsequenz von NIF3L1 stromabwärts des Promotors für die T3-RNA-Polymerase in den pBluescript SK II –Vektor (Stratagene) kloniert.

Der Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

- 2 µg pBluescript-NIF3L1
- 25 µl TNT-Retikulozytenlysat
- 2 µl TNT-Reaktionspuffer
- 1 µl T3-RNA-Polymerase
- 1 µl 1mM Aminosäuremischung ohne Methionin
- 1 µl <sup>35</sup>S- Methionin (1000 Ci/mmol; 10 µCi/µl)
- 40 U RNase Inhibitor
- ad 50 µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde 90 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend konnte das gebildete NIF3L1 ohne vorherige Aufreinigung für den GST-Pulldown verwendet werden.

### **8.8.2 Expression und Isolierung der Kandidaten-Proteine als GST-Fusionsproteine**

Die GST-Fusionsproteine wurden in *Escherichia coli* BL-21 exprimiert, die mit den rekombinanten pGEX-4T-Plasmiden transformiert worden waren. Die Proteinexpression von einem pGEX-4T-Plasmid steht unter der Kontrolle eines tac-Promotors, der durch das Laktose-Analogon IPTG induziert wird. Durch zeitlich begrenzte IPTG-Applikation kann so die gebildete Proteinmenge kontrolliert werden. 100 ml LB-Nährlösung (+ 50 µg/ml Ampicillin) wurden mit 5 ml einer Übernachtskultivierung von *E. coli* BL-21/pGEX-4T angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Induktion erfolgte nach 2 h mit 100 µl IPTG (100 mM). Nach weiteren 3 h Wachstum bei 37°C wurden die Zellen geerntet und in 5 ml eiskalter PBS-Proteaseinhibitoren-Lösung suspendiert. Der Zellaufbruch wurde mit einer Ultraschallbehandlung erzielt (Branson Sonifier 250, 4 x 20 sec, gepulst, Leistungsgrad 5). Das Zelllysat wurde nach Zugabe von 250 µl Triton X-100 (20%ig) 20 min bei RT leicht geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (12 000 x g, 10 min, 4°C). Der so erhaltene Zell-Rohextrakt wurde mit 100 µl 50%iger Glutathion-Sepharose 4B (=50 µl Bettvolumen) vermischt und unter leichtem Schütteln 2h bei 4°C inkubiert. Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde die Sepharose-Matrix pelletiert, dreimal mit 500 µl PBS-Proteaseinhibitorenlösung gewaschen (Zentrifugationen: 5000 x g, 5 min, 4°C) und schließlich in 150 µl dieser Lösung suspendiert.

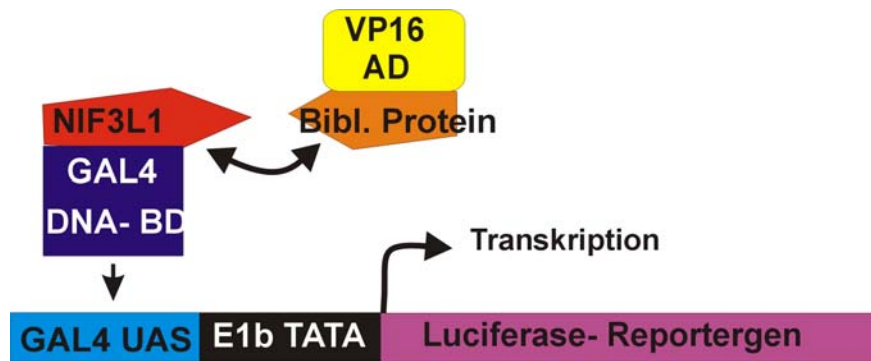
### 8.8.3 Pulldown-Inkubation und Analyse mittels SDS-Page und Autoradiographie

25 µl *in vitro* exprimiertes NIF3L1 und 30 µl aufgereinigtes Sepharose-GST-Fusionsprotein wurden zusammen mit 200 µl Bindepuffer (II.4) 2 h unter leichtem Schütteln bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose (einschließlich der gebundenen Moleküle) pelletiert (10 000 x g, 10 min, RT) und zunächst einmal mit 200 µl Bindepuffer, dann mit jeweils 200 µl Waschpuffer für den GST-Pulldown (II.4) so oft gewaschen, bis das Pellet, das aufgrund des Retikulozytenlysates anfangs rot war, eine eindeutig weiße Farbe aufwies. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Pellet in 15 µl Waschpuffer suspendiert, mit dem gleichen Vol. an SDS-PAGE-Probenpuffer (2fach konz.) versetzt und vor dem Auftragen 7 min bei 95 °C inkubiert. Die SDS-PAGE wurde mit einer 10 x 15 cm großen Gelkammer mit einem 8%igen Gel durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von 3 h bei 50 mA. Anschließend wurde das Gel über Nacht in Entfärbelösung für Polyacrylamidgele fixiert. Vor dem Auflegen eines Röntgenfilms musste das Gel 1 h bei 70°C in einem Vakuumtrockner entwässert werden. Der Film wurde ca. 20 h bei RT exponiert.

### 8.9 Mammalian-Two-Hybrid-System (Tsan et al., 1997)

Dem Mammalian-Two-Hybrid-System liegt prinzipiell die gleiche Verfahrensweise zugrunde wie dem Yeast-Two-Hybrid-System: Ein Transkriptionsaktivator, dessen DNA-Bindungs- und Aktivierungsdomäne zuvor durch Manipulation getrennt wurden, wird durch die Interaktion zweier Proteine funktionell rekonstituiert und bewirkt die Transkription eines Reportergens, wodurch die Interaktion detektierbar wird. Im Gegensatz zum Hefesystem, bei dem man sich des physiologischen Transkriptionsaktivators GAL4 bedient, wird in den Säugetierzellen ein künstlich zusammengesetzter Transaktivator benutzt, der zum einen aus der DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Proteins der Hefe und zum anderen aus der Transaktivierungsdomäne des VP16-Proteins des Herpes simplex-Virus besteht. Darüber hinaus besitzen Säugetierzellen kein Gen, das als Reportergen geeignet ist, so dass zu diesem Zweck das Luciferase-Gen, integriert in ein Plasmid, cotransfiziert werden muss. Dieses steht unter der Kontrolle der UAS-Sequenz, der Erkennungsstelle der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (Abb. 4). Das Mammalian-Two-Hybrid System wurde angewendet, um Protein-Interaktionen, die im Yeast-Two-Hybrid-System identifiziert worden waren, zu verifizieren. Für die Transfektion

mussten sowohl das NIF3L1 als auch die im Yeast-Two-Hybrid-System isolierten potentiellen Interaktionspartner in Säugetier-Expressionsvektoren umkloniert werden. Dabei wurde NIF3L1 hinter der VP16-Aktivierungsdomäne rekombiniert. Sämtliche anderen Interaktionspartner wurden in pM-Vektoren unmittelbar hinter die Sequenz der GAL4-DNA-Bindungsdomäne integriert.



**Abb. 4** Schematische Darstellung des Mammalian-Two-Hybrid-Systems. Der Transkriptionsaktivator besteht aus der GAL4 DNA-BD der Hefe sowie aus der Aktivierungsdomäne des VP16-Proteins des Herpes simplex Virus. Eine Interaktion zwischen NIF3L1 und einem Interaktionspartner rekonstituiert den Transkriptionsaktivator und aktiviert die Transkription des Luciferase-Reportergens, das sich stromabwärts der GAL4 Erkennungsstelle (UAS) und des verkürzten Promotors des Adenovirus E1b-Gens befindet.

### 8.9.1 Luminometrische Messungen

Zur Durchführung des Mammalian-Two-Hybrid-Systems wurden Maus NIH3T3-Fibroblastenzellen mit den Konstrukten pVPFlag5-NIF3L1, pM2-IF1 und GAL4-Luc sowie mit den Konstrukten pVPFlag5-NIF3L1, pM3-NIF3L1 $\alpha$ -1 und Gal4-Luc transient transfiziert (II. 9.2). Darüber hinaus wurden die Konstrukte GAL4/STAT2 sowie pM1/BR-304 und pVP-HA/B202-NB als Positivkontrollen verwendet. Das Konstrukt GAL4/STAT4 erlaubt die Expression eines funktionellen Transaktivators, bestehend aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und der STAT2-Aktivierungsdomäne. Bei der Plasmidkombination pM1/BR304 und pVP-HA/B202-NB interagieren die beiden Polypeptide BR-304 (Teil des BRCA1-Proteins) und B202-NB (Teil des BARD1-Proteins) und führen so DNA-Bindungsdomäne (GAL4-DNA-BD in pM1) und Aktivierungsdomäne (Vp16 in PVP-HA) zusammen, wodurch das Luciferase-Reportergen aktiviert wird (Wu et al., 1996). Als Nega-



tivkontrollen wurden leere Vektoren transfiziert bzw. ein leerer Vektor in Kombination mit dem komplementären Partner mit Insert. Jede Transfektion wurde im Duplikat ausgeführt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Fibroblasten nach Entfernen des Mediums und nach Zugabe von 200 µl Lyse-Puffer für Säugetierzellen mechanisch von ihrem Untergrund abgelöst. Dieser Puffer bewirkte gleichzeitig den Aufschluss der Zellen und die Freisetzung ihres Inhalts. Anschließend wurde die Zellsuspension 2 min bei RT mit 15000 x g zentrifugiert. Die Proteine lagen im Überstand vor.

### **Messung der Luciferase-Aktivität**

Im Mammalian-Two-Hybrid-System, in dem das Luciferase-Gen als Reportergen verwendet wird, ist die Interaktion zweier Proteine anhand der Luciferase-Aktivität quantitativ nachweisbar. Die Luciferase katalysiert eine Biolumineszenz-Reaktion, in der das Substrat Luciferin mit ATP zu einem Zwischenprodukt (Adenylat) umgesetzt wird, das unter Oxidation zur Emission von Licht führt. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden 50 µl Zell-Rohextrakt eingesetzt und mit 200 µl Luciferase Reaktionspuffer vermischt. Auslöser der spezifischen Reaktion waren 100 µl Luciferase-Injektionspuffer, die dem Ansatz 20 sec vor Beginn einer Probenmessung automatisch zugeführt wurden. Die emittierten Lichtsignale wurden im Luminometer in einer Zeitspanne von 20 sec detektiert und als „relative light units“ (RLU) angezeigt.

### **Messung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität**

In allen Transfektionsansätzen wurde standardmäßig ein Plasmid in stets der gleichen Menge (0,1 µg) cotransfiziert, das das lacZ-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors trägt (pCMV- $\beta$ Gal). So war es möglich, durch Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität die Werte der Luciferase-Aktivität verschiedener Ansätze trotz etwaiger Abweichungen der Transfektionseffizienz zu normalisieren und miteinander zu vergleichen. Die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase wurde unter Verwendung des Galacto Light Kits (Tropix, Bedford, MA) im Luminometer bestimmt. Hierzu wurden 8 µl Zell-Rohextrakt zusammen mit 70 µl Reaktionspuffer (Galacto-Light Reaction Buffer Diluent mit 1% Galacton) 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Dreißig sec vor der Messung wurden vom Luminometer automatisch 100 µl eines Light-Emission-Accelerators in die Probe injiziert. Die Meßzeit je Probe betrug hier 30 sec.

## **9. Zellbiologische Methoden**

### **9.1 Kultur eukaryontischer Zellen**

Die verwendeten adhärent wachsenden Zelllinien wurden in käuflich erworbenem DMEM-Medium (Gibco/BRL, Karlsruhe) mit Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM Glutamin und 10% FKS in oberflächenbehandelten Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C. In Abhängigkeit von der Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche geteilt. Die Zellen wurden dabei mit 1 x PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA in Ca/Mg-freier PBS-Lösung) 5 min inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurden 1:5 bis 1:10 Verdünnungen in frischem Medium hergestellt. Zur Langzeitaufbewahrung wurden 2-3 x 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml Einfriermedium (Gibco, BRL) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### **9.2 Transfektionsmethoden**

#### **9.2.1 Transiente Transfektionen**

Transiente Transfektionen eukaryontischer Zellen wurden mit dem Superfect-Transfektions-Reagenz (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Bei dieser Transfektionsmethode wird die in den Zellen eingeführte DNA nicht in das Genom integriert. Die Methode wird verwendet, um die Aktivität von Reportergenen zu detektieren, da zahlreiche Kopien der transfizierten Plasmide in der Zelle vorliegen und so große Proteinmengen exprimiert werden. Die für die Transfektion vorgesehenen Zellen wurden in 75-cm<sup>2</sup>-Flaschen mit 10 ml Säugerzellen-Medium (DMEM+Zusätze) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen, die eine konfluente Schicht gebildet hatten, mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung geerntet, gezählt und so verteilt, dass eine Sechs-Schalen-Kulturplatte ungefähr 140.000 Zellen enthielt. Diese Zellzahl produzierte bis zum Zeitpunkt der Transfektion eine 40-80%ige Konfluenz. Für die Bildung der Dendrimer-Komplexe wurde eine Gesamtmenge von bis zu 2 µg zu transfizierender Plasmid-DNA mit DMEM (ohne Zusätze) auf 100 µl aufgefüllt und zusammen mit 10 µl Superfect-Transfektions-Reagenz 10 min bei RT inkubiert. Die Transfektio-

onsmischung wurde anschließend mit 600 µl DMEM (mit Zusätzen) vermischt und auf die Zellen gegeben, die zuvor mit PBS gewaschen worden waren. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium einschließlich verbliebener Komplexe entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, bevor sie weitere 24-48h in frischem DMEM inkubiert wurden.

### 9.2.2 Stabile Transfektionen:

#### **Herstellung einer immortalisierten Spermatozyten-Zelllinie GC-4spc**

Sechs bis acht Testes der transgenen Maus-Linie TC (Nayernia et al., 1994) wurden dekapsuliert und in serumfreiem Kulturmedium CMRL-1066 (Gibco/BRL) aufbewahrt. Interstitielle Zellen wurden durch leichtes Schwenken entfernt. Die isolierten Tubuli seminiferi wurden für 30 min in 0,1%iger Collagenase-Lösung und in 0,01% Trypsin-Inhibitor-Lösung (Boehringer, Mannheim) inkubiert. Auf einen DNase-Verdau wurde verzichtet, da dieser die spätere Transfektion beeinträchtigen würde. Nach einem Waschritt in ERKB-Puffer und einer Zentrifugation bei 200 x g für 10 min bei RT, wurden die Zellen in einer Konzentration von 2 x 10<sup>6</sup>-Zellen/ml in serumfreiem DMEM-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem PBS-Konstrukt (III. 4.1) transfiziert, unter Verwendung von Tfx50 (Promega, Madison, USA) als Lipofektionsreagenz im Verhältnis von 4:1 (v/v). Die Zellsuspension wurde in eine 60-mm Kulturflasche gegeben und nach 2 h wurde das serumfreie- mit serumhaltigen Medium gewechselt. Die Zellen inkubierten für 36 Tage bei 37°C und in 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und durch Zugabe von G418 (Gibco BRL) in einer Konzentration von 200 µg/ml selektiert. Das Selektionsmedium wurde für 2-3 Wochen zugegeben bis einzelne stabile Transfektanten isoliert werden konnten, diese wurden dann weiterkultiviert.

### 9.3 CAT-ELISA (Porsch et al., 1993 )

Das CAT-Enzym, das in eukaryontischen Zellen nicht gebildet wird, überträgt Acetyl-Gruppen von Acetyl Coenzym A (Acetyl-CoA) auf die 3'-Hydroxylposition von Chloramphenicol. Aus dem gebildeten 3'-Monoacetylderivat entsteht je nach Aktivität des Enzyms durch Umlagerung die 1'-Acetyl-Verbindung und in einem weiteren enzymatischen Schritt kann das

1,3-Diacetyl-Chloramphenicol entstehen. Bei dem CAT-ELISA wird die Aktivität des Enzyms nichtradioaktiv nachgewiesen, die Methode wurde mit dem CAT-ELISA Kit (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor mit einem spezifischen Promoter und dem CAT (Chloramphenicolacetyltransferase)-Reportergen transfiziert, einschließlich dem pCAT3-Basic - und dem pCAT3-Control-Vektor (Promega, Madison, WI) als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Nach einer Inkubation von 48 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Lysis Puffer (Boehringer, Mannheim) für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellextrakte wurden geerntet und für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Zellextrakte wurden einer Proteinbestimmung nach Bradford et al. (II. 8.2) unterworfen. Anschließend wurde für eine quantitative Bestimmung der CAT-Enzymaktivität ein colorimetrisch-enzymatischer Immunoassay durchgeführt. Jeweils 200 µl einer 1:2-, 1:4- und 1:8- Verdünnung des Zellextraktes wurden in die Schalen der Mikrotiterplatten (MTP) (Boehringer) pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Lösungen wurden abgenommen und es wurde fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 200 µl des anti-CAT-Digoxigenin (anti-CAT-DIG) –Antikörpers in jede Schale gegeben und wieder für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und 200 µl des anti-DIG-Peroxidase –Antikörpers (anti-DIG-POD) wurden in jede Schale gegeben, wiederum wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden gleich im Anschluss 200 µl Peroxidase in jede Schale gegeben. Die Absorption jeder Schale wurde bei 405 nm in einem UV/VIS-Spektrometer (Eppendorf) gemessen. Die gewonnenen Daten wurden normalisiert in Bezug auf die Daten der pCAT3-Kontroll-transfizierten Zellen und in Bezug auf die gesamte Proteinkonzentration des Zellextraktes.

### **9.4 Matrigel Assay** (Albini et al., 1987)

Ein Matrigel-Invasivitätsassay wurde durchgeführt, um die immortalisierten Zelllinien GC-1spg und GC-4spc bezüglich ihrer Invasivität *in vitro* zu untersuchen. Die Matrigel-Matrix wurde in sechs-Schalen-Platten verteilt und mit 100 µl vorgewärmten DMEM-Medium für zwei Stunden bei Raumtemperatur rehydriert. Ungefähr  $3.5 \times 10^5$  Zellen wurden geerntet, gewaschen und in Kulturmedium resuspensiert. Die Zellen wurden auf die Biocoat Matrigel-Membran gegeben (Becton-Dickinson) und für 48 h bei 37°C inkubiert. Die untere Kammer wurde zuvor mit 750 µl DMEM- Medium gefüllt. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf

der oberen Fläche entfernt. Die Zellen in der unteren Hälfte wurden für 10 min in 100% Methanol fixiert und anschließend in Hämatoxilin und Eosin gefärbt. Die Zellen, die zur unteren Fläche gewandert sind, wurden unter einem Lichtmikroskop (Zeiss) bei einer 100fachen Vergrößerung gezählt. Maus NIH3T3-Fibroblastenzellen wurden als Kontrollzellen genommen.

Die prozentuale Invasion bzw. der Invasions-Index wurden ausgedrückt als:

$$\% \text{ Invasion} = \frac{\text{Durschnitt der Zellen, die durch die Membran diffundieren} \times 100}{\text{Durchschnitt der Zellen der Negativkontrolle, die durch die Membran diffundieren}}$$

$$\text{Invasion Index} = \frac{\% \text{ Invasion Test-Zellen}}{\% \text{ Invasion Kontroll-Zellen}}$$

Eine Zufallswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurde angenommen.

### 9.5 Immunhistochemische Färbung eukaryontischer Zellen

Die Zellen wurden bis zu einer 20-80%igen Konfluenz auf spezielle Objektträger mit angehefteter Kulturflasche (2 cm x 6 cm) in serumhaltigen DMEMs (Gibco BRL, Karlsruhe) kultiviert. Die Zellen wurden kurz in PBS gewaschen und in 100%igem Methanol für 5 min fixiert. Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu sättigen, wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min in 0.1%iger Hydrogenperoxid-Lösung (gelöst in PBS) inkubiert. Es folgte ein erneutes Waschen in PBS und eine 20 minütige Inkubation der Zellen bei RT in 1.5%iger Blockierungslösung (ABC Kit, Oncogene Science, Cambridge). Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit dem primären Antikörper in einer Konzentration von 0.5 µg/ml in PBS mit 1% BSA für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem Waschritt in PBS folgte eine 30 minütige Inkubation mit einem Biotin-gekoppelten sekundären Antikörper (ABC-Kit). Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit einem Avidin-Biotin-Enzymreagenz für 30 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min in PBS gewaschen. Es folgte eine kurze Behandlung der Zellen mit 0.5% Triton X-100 in PBS für 30 sec und eine Inkubation für 6 min in Diaminobenzidin-Lösung. Unmittelbar danach wurden die Zellen mit H<sub>2</sub>O abgespült und unter dem Mikroskop (BX-60,

Olympus) betrachtet. Als Negativkontrolle wurden die Zellen der gleichen Prozedur unterzogen, ohne eine Inkubation mit dem primären Antikörper.

### 9.6 Zelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen

Für die zelluläre Lokalisation von NIF3L1 bzw. IF1 wurde der jeweilige komplette offene Leserahmen in den pECFP-C1-Vektor kloniert (Clontech, Heidelberg). Dabei wurde beachtet, dass sich der Leserahmen nicht veränderte. Es entstand ein Fusionskonstrukt, bei dem NIF3L1 bzw. IF1 an den C-Terminus der ECFP-kodierenden Sequenz gekoppelt ist. Das Gen ECFP („enhanced cyan fluorescent protein“) kodiert für eine Variante des GFP (grün-fluoreszierendes-Protein) aus *Aequorea victoria*. Maus NIH3T3-Fibroblastenzellen wurden auf speziellen Objektträgern mit aufgesetzter Kulturflasche (Nunc, Wiesbaden) kultiviert und gemäß (II.9.2.1) mit dem pECFP-C1-NIF3L1-Konstrukt transient transfiziert. Nach einer 24 stündigen Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 10 min in 100% Methanol fixiert. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Boehringer, Mannheim) gegengefärbt. Die Zellen wurden anschließend unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (BX-60, Olympus) betrachtet.

### 10. Methoden zur Erzeugung transgener Mäuse (Hogan et al., 1994)

Für die Erzeugung der PGK2-LTA bzw. TSPY-LTA transgenen Mäuse wurde die Mikroinjektion, d.h. die Einführung der DNA mit Hilfe einer feinen Glaskapillare in den männlichen Vorkern, verwendet. Nach der Superovulation wurden die befruchteten Eizellen isoliert und die DNA wurde in den männlichen Vorkern mikroinjiziert. Die überlebenden mikroinjizierten Oozyten wurden anschließend in die Eileiter eines scheinträchtigen Empfängertieres retransfiziert. Die geborenen Mäuse wurden zum Nachweis der Integration der Fremd-DNA analysiert. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR unter Verwendung sequenzspezifischer Primer bzw. mittels genomischer Southern Blots. Die transgenen Mäuse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Nayernia, Institut für Humangenetik, Universität Göttingen, sowie in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Molekulare Medizin, Göttingen, erstellt.

### **10.1 Vorbereitung der DNA für die Mikroinjektion**

Das für die Mikroinjektion vorhergesehene DNA-Fragment wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus dem Vektor isoliert und über ein Agarosegel isoliert. Die DNA wurde in Mikroinjektionspuffer aufgenommen und auf eine Konzentration von 1-2 ng/µl eingestellt. Bei einer Konzentration von 1 ng/µl und einer Größe von ca. 3 kb entspricht dies ungefähr 500 Molekülen. Integrationsstudien haben gezeigt, dass die DNA in linearisierter Form am besten integriert und die Beschaffenheit der Enden keine Bedeutung für die Integrationseffizienz besitzt (Brinster et al., 1985).

### **10.2 Vorbereitung der Halte- und Injektionspipetten**

Die Haltepipetten für die Arretierung der Oozyten während der Injektion werden aus Borsilikatglaskapillaren über einer möglichst kleinen Brennerflamme auf einen Durchmesser von 80 bis 150 µm ausgezogen und mit einer Pinzette so abgebrochen, dass ein glatter Bruch entsteht. In einer Mikroschmiede (Bachhofer, Reutlingen) wird die Öffnung der Haltepipette auf einen inneren Durchmesser von 10 bis 15 µm unter Sichtkontrolle zugeschmolzen. Die Injektionspipetten werden aus Borsilikatglaskapillaren mit Innenfilament (Clark Electromedical Instrument; Pangbourne Reading, UK) in einem horizontalen Pipettenpuller (Bachhofer, Reutlingen) hergestellt.

### **10.3 Mikroinjektion**

Zur Mikroinjektionsapparatur (Eppendorf, Hamburg) gehören ein inverses Mikroskop mit verschiedenen Objektiven, zwei Mikromanipulatoren, eine Mikrometerspritze, um die Haltepipette zu kontrollieren sowie ein Mikroinjektionsgerät mit angeschlossenem Kompressor. Die Haltepipette ist über einen Portex-Schlauch mit der Mikrometerspritze verbunden. Vor der Injektion wird die Haltepipette mit frischem M2-Medium aufgefüllt. Die Injektionspipette ist über einen luftgefüllten Schlauch direkt mit dem Mikroinjektionsgerät verbunden. Dieses ist an einen Kompressor angeschlossen, der einen konstanten Druck aufbaut. Mit Hilfe des Mikroinjektionsgerätes lässt sich der für die Mikroinjektion benötigte Druck einstellen, der

zwischen 30- 400 hPa liegt. Ungefähr 10 bis 20 Oozyten wurden auf einen Hohlschliffobjektträger und in einem Tropfen M2-Medium unter Paraffinöl gegeben. Die Objektträger wurden auf dem Mikroskopisch fixiert und der Vorkern der Oozyten wurde fokussiert. Die Injektionspipette wurde durch die Zona pellucida und die Plasmamembran hindurchgestochen. Es wurden ca. 1-2 pl (1-2 fg DNA) injiziert. Ein Anschwellen des Vorkerns zeigt eine erfolgreiche Injektion an. Um intakte von geschädigten Oozyten zu trennen, wurden diese 1 h in M16-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### **10.4 Retransfer mikroinjizierter Oozyten**

Überlebende Oozyten wurden in die Eileiter pseudoschwangerer NMRI-Weibchen (Fostermütter) retransferiert. Die Weibchen wurden am Vorabend mit vasektomierten Männchen gepaart und am folgenden Morgen auf einen vorhandenen Vaginalpropf untersucht. Zum Retransfer wurde einem sogenannten Fostertier unter Narkose mit einer Schere ein ca. 1cm langer Schnitt am Rumpf, parallel zur Wirbelsäule, gesetzt. Über dem rötlich durchscheinenden Ovar wurde ein kleines Loch in die Unterhaut geschnitten und mittels Pinzette wurde das Ovar am anliegenden Fettgewebe herausgezogen. Das Fettgewebe wurde mit einer Gefäßklammer so positioniert, dass Ovar, Ovidukt und Uterus erkennbar waren. Unter dem Stereomikroskop wurde die Bursa lokalisiert und mit Adrenalinlösung zur Verringerung von Blutungen betropft. Die Bursa wurde angerissen und der Eileiter so positioniert, dass die Ampulle erkennbar war. Da nur etwa 20 % der retransferierten Oozyten ausgetragen werden, ist eine entsprechend große Anzahl von Oozyten notwendig. Aus diesem Grund wurden 10-20 Oozyten in eine Retransferpipette perlenschnurartig eingesaugt. Das Infundibulum wurde mit einer Pinzette gehalten, die Retransferpipette eingeführt und die Oozyten in die Ampulle in Richtung Eileiter gedrückt. Nach dem Retransfer wurden die Organe mit einer stumpfen Pinzette wieder in den Bauchraum gebracht und Ober- und Unterhaut mit einer Wundklammer verschlossen. Die geborenen Nachkommen wurden nach 21 Tagen auf Transgenität überprüft und nach 56 Tagen mit Wildtyp-Männchen bzw. -Weibchen verpaart.



### **11. Histologische Techniken**

#### **11.1 Herstellung von Paraffinschnitten aus Geweben und Organen**

Das frisch präparierte Material wurde direkt in das entsprechende Fixativ gegeben und je nach Größe des Präparats für eine Stunde bis zu einer Woche bei RT fixiert. Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90% und 96%) wurde das Gewebe entwässert. Um den Ethanol vor der Einbettung in das Paraffin vollständig zu entfernen, wurde das Gewebe über Nacht in Methylbenzoat inkubiert. Für die Einbettung wurde das Paraffin im Wasserbad bei 58°C geschmolzen. Die Einbettung bestand aus mehreren Schritten, die sämtlich bei 58°C durchgeführt wurden. Für die Entfernung des Methylbenzoats wurde das Gewebe zweimal mit Benzol und zweimal in einem 1:1 Benzol/Paraffin-Gemisch jeweils für 1 h inkubiert. Zur vollständigen Durchdringung des Gewebes mit dem Paraffin wurde das Präparat anschließend zweimal für 1 h in Paraffin inkubiert. Im Anschluss daran wurde die auf 58°C temperierte Einbettungsform etwa zur Hälfte mit geschmolzenem Paraffin gefüllt, das Gewebe in die Form überführt und mit Paraffin aufgefüllt. Nach der Aushärtung über Nacht wurde der Paraffinblock aus der Form genommen und bei 4°C gelagert. Die Paraffinblöcke mit dem fixierten Material wurden zu Quadern optimaler Größe zurechtgeschnitten und in das Mikrotom (Hn 40 Ing., Nussloch) eingespannt. Die Schnittdicke betrug 5–8 µm. Mit Hilfe eines feinen Pinsels wurden die Schnitte auf die vorbehandelten Objektträger übertragen. Um eine bessere Haftung der Schnitte zu erreichen, wurden die Objektträger mit einem Tropfen 70%igem Ethanol benetzt und diese auf einer 40°C warmen Heizplatte erwärmt. Die Schnitte wurden direkt auf den Ethanoltropfen aufgelegt und solange auf der Wärmeplatte inkubiert, bis das Ethanol vollständig verdampft war. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte licht geschützt bei 4°C gelagert.

#### **11.2 Hämalaun-Eosin Färbung von Testisschnitten**

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Testisschnitte mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Die Zellkerne färben sich hierbei blau. Alle anderen Zellstrukturen werden durch Eosin rötlich gefärbt. Die Schnitte wurden zunächst für 2 x 10 min in Xylol-Ersatz entparaffiniert und

anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe für jeweils 2 min rehydriert. Die Färbung erfolgte zunächst für 5-10 min in Hämalan. Anschließend wurde gründlich mit H<sub>2</sub>O gespült und 5-10 min mit Eosin-Färbelösung (Eosin-Stammlösung 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt) gegengefärbt. Die Schnitte wurden in H<sub>2</sub>O gespült, dehydriert (50%, 70%, 90%, 100%) und naß mit Eukit eingedeckt.

### 11.3 Keimzellseparation (Romrell et al., 1976)

Die Testes wurden entnommen und kurz in 1 x PBS-Puffer gewaschen. Die Tunica albuginea wurde entfernt und der Inhalt der Testes in 120 ml Collagenase-Lösung bei 33°C für 30 min inkubiert. Die Tubuli seminiferi wurden durch Zentrifugation (10 min, 200 g, 4°C) pelletiert und zweimal in 50 –75 ml EKRB-Puffer gewaschen. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Tubuli 15 min in 60 ml Trypsin/DNase-Lösung bei 33°C inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation wurden die Tubuli zunächst in 60 ml kalter 0.5%iger BSA-Lösung gewaschen und dann in 30 ml kalter BSA/DNase-Lösung aufgenommen. Zur Entfernung von Geweberesten wurde die Suspension durch eine sterile Gaze filtriert und mit kalter 0.5%iger BSA-Lösung auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt. Von dieser Suspension wurde 1 ml für die mikroskopische Analyse entnommen. Die Separation der Keimzellen erfolgte nach dem Prinzip der gravitationsabhängigen Sedimentation in einem BSA-Gradienten in einer Zellseparationskammer (Celsep<sup>TM</sup>, Depart Inc. Washington, Delaware, USA). Der BSA-Gradient wurde in der Kammer im Kühlraum bei 4°C wie folgt vorbereitet: Über einen Gradientenmischer wurde in der Kammer in schräger Position (30°) mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (20 ml/min) ein Gradient aus je 450 ml 2%- und 4%-iger BSA-Lösung gemischt. Der BSA-Gradient wurde, bis die Kammer vollständig gefüllt war, mit 200 ml 10%iger BSA-Lösung unterschichtet. Durch Abpumpen des 10%igen Gradientenkissens wurde die Zellsuspension auf den BSA-Gradienten gesogen und die Kammer in die horizontale Stellung abgesenkt. Die Sedimentation wurde nach 90 min gestoppt und die Kammer in die 30° Position zurückgebracht. Durch Abpumpen wurden 50 ml Fraktionen gesammelt, von denen je 1 ml in einer 24-Loch Minikulturplatte (Greiner, Nürtingen) mikroskopisch beurteilt wurde. Die Fraktionen mit angereicherten Pachytänspermatozyten, runden Spermatiden und elongierten Spermatiden wurden bestimmt, die Zellen dieser Fraktionen pelletiert (10 min, 200 x g, 4°C). Die Zellen gleichen Typs wurden in 200 µl 1 x PBS vereinigt und bei –70°C eingefroren.

### 11.4 Immunlokalisierung von Proteinen in Paraffinschnitten

Deparaffinierte Schnitte wurden 5 min in PBS/ 1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Präparate wurden 2 x 5 min in PBS gewaschen und die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Unspezifische Bindungsstellen wurden 30 min mit 50–100 µl 5% Ziegen-Normalserum in PBT abgesättigt. Danach wurde erneut überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt. Auf das Präparat wurden 10 µl der monospezifischen Antikörperlösung (2 µg/ml) gegeben und mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt. Die Schnitte wurden 2 h in einer feuchten Kammer mit PBS als Puffer inkubiert. Unspezifische Antikörper-Bindungen wurden in PBT 4 x 10 min abgewaschen. Der Zweitantikörper (Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-alkalische Phosphatase) wurde 1:500 in PBT verdünnt. Pro Objektträger wurden 50–100 µl Antikörperlösung eingesetzt. Nach 2 h Inkubation in einer feuchten Kammer wurden nicht gebundene Antikörper 4 x 10 min in PBT ausgewaschen. Das Gewebe wurde in Puffer 3 für 2 min umgepuffert, bevor 50 µl Färbelösung auf den Schnitt gegeben wurden. Die Farbreaktion erfolgte unter einem Deckglas und wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Durch Eintauchen der Objektträger in TE-Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Danach wurden die Präparate in H<sub>2</sub>O kurz gewaschen und mit einem Tropfen Aqua-Polymount eingedeckelt.

### 11.5 *In-Situ* End-Labeling (ISEL) (Wijsman et al., 1993)

Beim Prozess der Apoptose kommt es zu charakteristischen Strangabrüchen. Bei der ISEL-Methode macht man sich diese Tatsache zunutze, indem man biotinierte Nukleotide *in situ* in die DNA-Strangbrüche durch eine DNA-Polymerase inkorporiert. Die eingebauten Nukleotide werden hieran immunhistochemisch gefärbt.

ISEL wurde an Testisschnitten der PGK2-LTA transgenen Mäuse angewendet. Dabei wurden Paraffin-Testisschnitte von homozygoten transgenen als auch von nichttransgenen Mäusen angefertigt (II.11.1). Nach erfolgter Deparaffinisierung wurden die Schnitte histologisch mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt (II.11.2). Danach erfolgte eine Inkubation der Schnitte mit Proteinase K (0.7 U/ml, gelöst in TBS) (Sigma, Deisenhofen) für eine Stunde bei 37 °C. Die Testisschnitte wurden mit TBS gespült und anschließend in 50 µl labelling mix (250 U/ml terminale Transferase, 20 µl/ml DIG-DNA-labelling mix und 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub> in Reaktions-

puffer für terminale Transferase) (Roche, Mannheim) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit TBS-Puffer wurden die Testisschnitte mit 10%igem fetalem Kälberserum (Roche) für 15 min geblockt. Anschließend wurden die Schnitte für 60 min mit einem alkalischer Phosphatase-konjugierten Antikörper gegen Digoxigenin (Roche) in einer Verdünnung von 1:250 inkubiert. Für die Detektion wurde 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat als Substrat hinzugegeben. Als Positivkontrollen wurden humane Lymphknoten mit reaktiven folikulären Hyperplasia verwendet. Die Durchführung der ISEL-Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Schweyer, Abt. Pathologie, Universitätsklinikum Göttingen.

### **11.6 Quantifizierung von Spermatozyten, Spermatiden und Sertoli-Zellen**

Spermatozyten, Spermatiden und Sertoli-Zellen wurden von den PGK2-LTA transgenen Mäusen in verschiedenen Altersstadien quantifiziert. Dabei wurden die Testes der transgenen und nichttransgenen Mäuse entnommen und in Bouin'scher Lösung fixiert (II.11.1). Nach ca. 48 h wurden die Testes in Paraffin eingelegt und histologische Schnitte auf Objektträgern angefertigt. Diese wurden einer Hämatoxilin- und Eosin-Färbung ausgesetzt (II.11.2). Die Auszählung der Zellen erfolgte unter einem Leica DMRE Mikroskop bei konstanter Vergrößerung. Für die Quantifizierung der Spermatozyten wurden die zu analysierenden Tubuli nach dem Zufallsprinzip ausgezählt. Bei den Spermatiden wurden die elongierenden Spermatiden in Tubuli des Stadiums VI der Spermatogenese gezählt. Für die Quantifizierung der Spermatozyten und der elongierenden Spermatiden wurde ein Minimum von 8000-10 000 Zellen gezählt. Sertoli Zellen wurden nach einer immunhistochemischen Färbung (II.11.4) mit einem anti-Vimentin Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg) abgeschätzt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte über einen Student's-T-Test. Eine Zufallswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurde angenommen. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Priv. Doz. Dr. A. Meinhardt, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Marburg durchgeführt.

### III. Ergebnisse

#### 1. PGK2-LTA transgene Mäuse

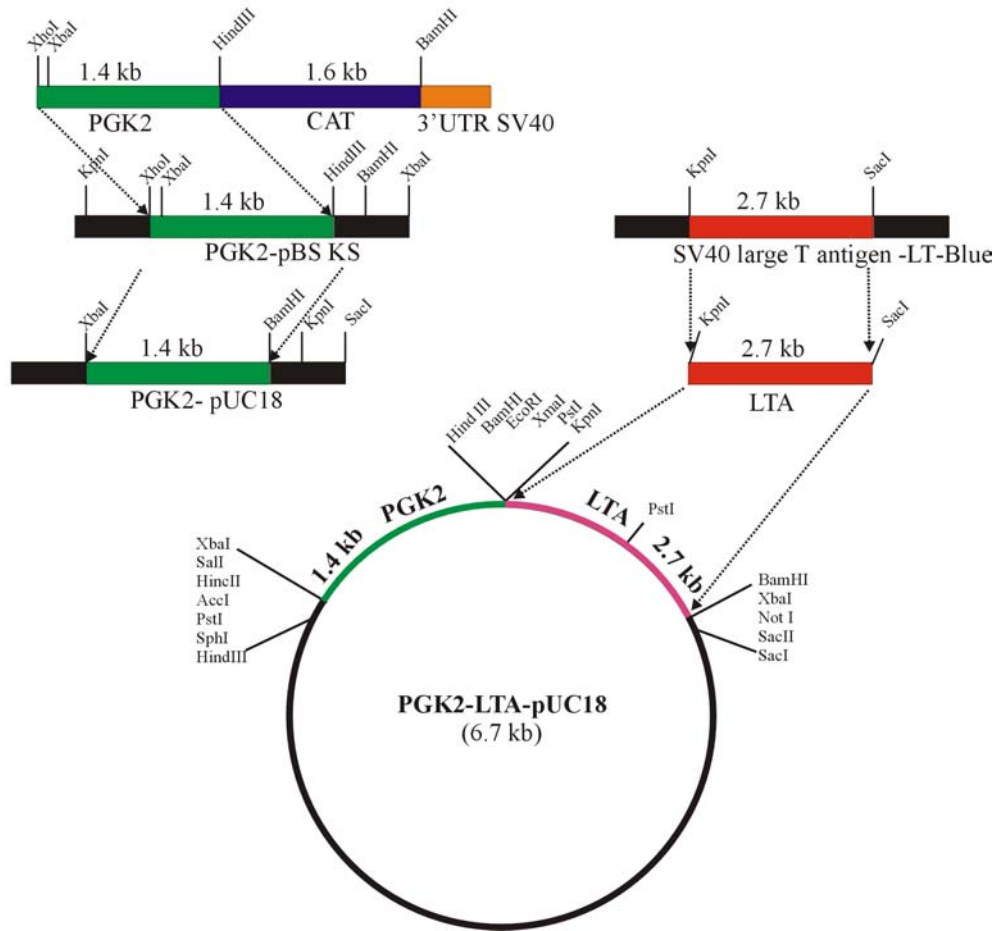
Im Rahmen des in *in vivo* Ansatzes sollten transgene Mäuse generiert werden, die das SV40 large T Antigen stadienspezifisch in den Spermatozyten exprimieren. Untersucht werden sollte, ob Spermatozyten die Potenz zur malignen Transformation besitzen. Dafür wurde eine 1.4 kb lange 5'-flankierende Sequenz des humanen PGK2-Gens an das SV40 large T Antigen gekoppelt. Das Pkg2-Gen wird bei der Maus ab dem 12. Tag in den Spermatozyten exprimiert (McCarrey et al., 1992).

##### 1.1 Herstellung des PGK2-LTA Konstrukts für die Mikroinjektion

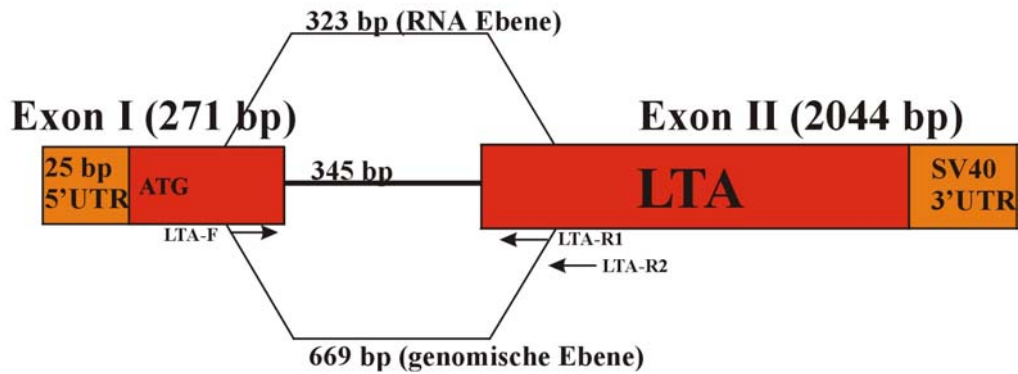
Der PGK2-Promotor wurde aus einem bereits getesteten PGK2-CAT-Konstrukt mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *Hind III* isoliert (Robinson et al., 1989). Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Erickson, University of Arizona, USA, zur Verfügung gestellt. Anschließend wurde das isolierte, 1.4 kb große Promotorfragment in den pBluescript KS -Vektor (Stratagene) *XhoI* und *Hind III* einkloniert. Die 5'-flankierende PGK2-Region wurde *XbaI/BamHI* geschnitten und in den pUC18-Vektor (Gibco BRL) *XbaI/BamHI* einkloniert (Abb. 5A). Parallel wurde das 2.7 kb große SV40 large T Antigen aus dem LT-Blue-Plasmid *KpnI/SacI* herausgeschnitten und isoliert. Es folgte eine Restriktion des Konstruktes PGK2-pUC18 mit den Enzymen *KpnI* und *SacI*. Das isolierte LTA-Fragment wurde dann in den *KpnI/SacI*- geschnittenen PGK2-pUC18 Vektor einkloniert. Dadurch entstand der Subklon PGK2-LTA-pUC18 (Abb. 5A). Aus diesem Klon wurde das Konstrukt PGK2-LTA mit *XbaI* restringiert, die entstandene 4 kb große Bande wurde isoliert und für die Mikroinjektion vorbereitet.

Die verwendete LTA-Sequenz umfasst 2.7 kb und besteht aus zwei Exons von jeweils 271 bp und 2044 bp sowie aus einem Intron von 345 bp. Das Exon I umfasst 25 bp der 5'-untranslatierten Region (UTR) sowie 246 bp kodierende Sequenz einschließlich des Translations-Startkodons ATG. Exon II enthält zu der kodierenden Sequenz zusätzlich 160 bp der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR SV40) (Abb. 5B).

**A**



**B**

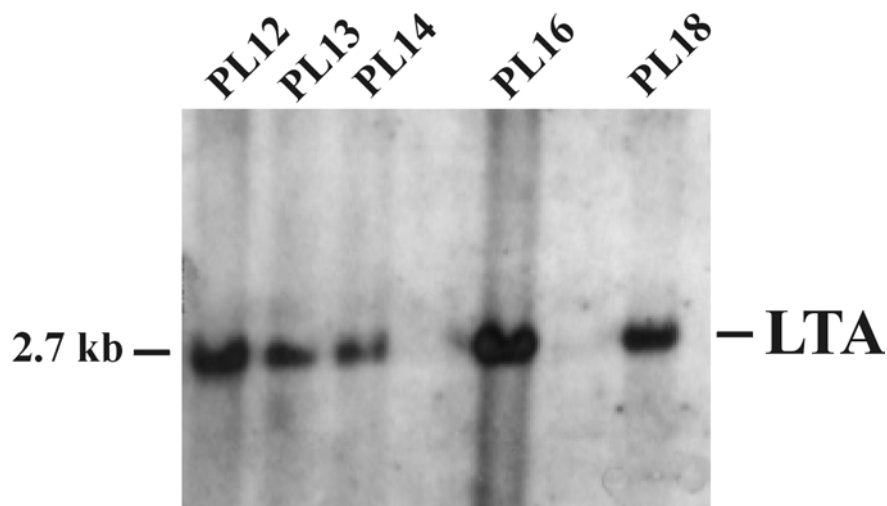


**Abb. 5** (A) Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Herstellung des Konstruktes PGK2-LTA für die Mikroinjektion. Die 1.4 kb große 5'-flankierende PGK2 Sequenz wurde *XhoI/HindIII* aus dem PGK2-CAT Konstrukt isoliert und mit den gleichen Schnittstellen in den pBluescript KS-Vektor (pBS KS) einkloniert. Hieraus wurde die PGK2-Promotorregion *XbaI/HindIII* herausgeschnitten und in den pUC18-Vektor einkloniert. Anschließend wurde dieser Klon mit *KpnI/SacI* geschnitten. Das 2.7 kb große LTA-Fragment wurde mit *KpnI/SacI* aus dem LT-Blue-Plasmid herausgeschnitten und in den PGK2-pUC18-Vektor einkloniert. (B) Schematische Darstellung der genomischen Struktur des SV40 large T Antigens. Exon I umfasst 271 bp inklusive 25

bp der 5'-UTR sowie 246 bp kodierende Sequenz. Exon II umfasst 1884 bp kodierende Sequenz sowie 160 bp der SV40 3'-UTR. Zwischen den beiden Exons befindet sich ein Intron von 345 bp. Darüber hinaus sind die Primer eingezeichnet, die in PCR-Reaktionen zur Amplifizierung eingesetzt wurden. Auf RNA-Ebene wurde mit den Primern LTA-F und LTA-R1 bzw. LTA-R2 ein 323 bp großes- und auf genomischer Ebene ein 669 bp großes Fragment amplifiziert.

## 1.2 Erzeugung transgener Mäuse

Das beschriebene PGK2-LTA-Konstrukt wurde in den männlichen Vorkern befruchteter Oozyten injiziert. Die mikroinjizierten Oozyten wurden anschließend in die Eileiter schein-schwangerer Mäuse retransferiert. Die geborenen Nachkommen wurden im Alter von 21 Tagen auf Transgenität untersucht. Dafür wurden Dot-Blot-, Southern Blot- bzw. PCR-Experimente durchgeführt. Insgesamt wurden 139 Zwei-Zell-Stadien, die die Mikroinjektion überlebten, in pseudoschwangere Weibchen retransferiert, die insgesamt 26 Nachkommen gebären. Von diesen 26 Mäusen wurden fünf als transgen identifiziert (Abb. 6). Diese wurden nach 56 Tagen mit Wildtypmäusen des Stammes NMRI verpaart. Drei Linien zeigten eine Transmission des Transgens an ihre Nachkommen (PL13, PL 16 und PL 18). Die transgenen Nachkommen wurden untereinander verpaart, so dass insgesamt drei homozygote Linien (PL 13, PL 16 und PL 18) aufgebaut werden konnten.

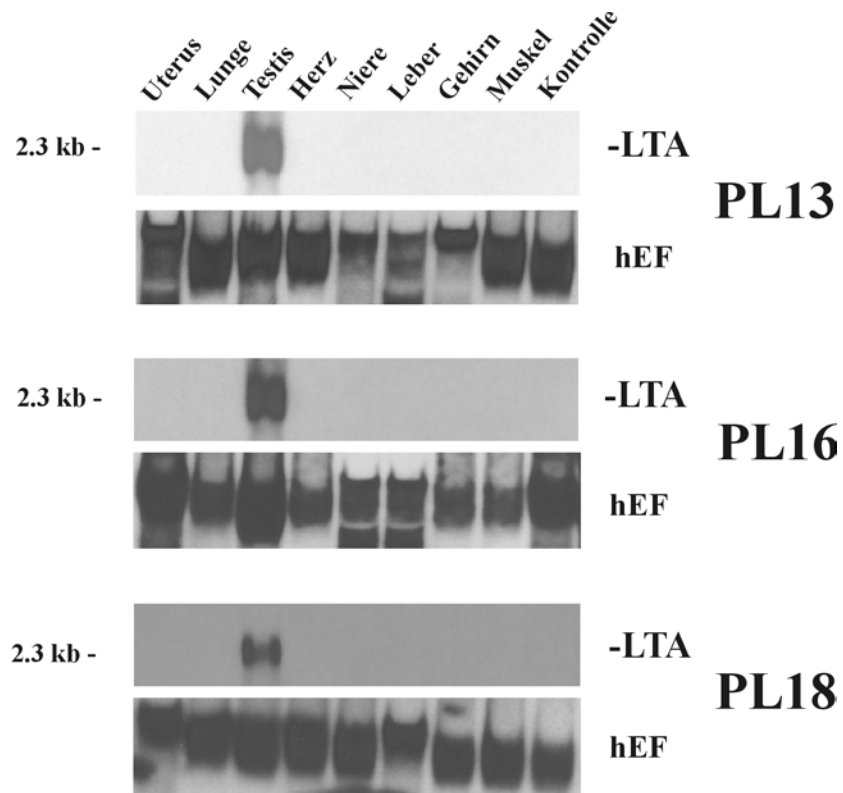


**Abb. 6** Southern Blot-Analyse der identifizierten Foundertiere. Jeweils 20 µg isolierte genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurde mit *EcoRI* verdaut und im Southern Blot mit einer LTA-spezifischen cDNA Sonde hybridisiert. Alle Foundertiere zeigten die charakteristische Bande von LTA bei 2.7 kb.

### 1.3 Expressionsanalysen in PGK2-LTA transgenen Mäusen

#### 1.3.1 Northern Blot-Analysen

Gesamt-RNA wurde aus Herz, Leber, Niere, Muskel, Gehirn, Lunge, Uterus und Testis homozygoter transgener Mäuse der Linien PL 13, PL 16 und PL 18 präpariert und jeweils 20 µg RNA in einer Northern Blot-Analyse eingesetzt. In allen drei Linien konnte das ca. 2.3 kb große LTA-Transkript ausschließlich im Testis detektiert werden (Abb. 7). Für die Hybridisierung wurde eine LTA-spezifische cDNA-Sonde verwendet. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurden die Northern Blots mit einer cDNA-Sonde für den ubiquitär-exprimierten humanen Elongationsfaktor (hEF) rehybridisiert (Hanes et al., 1992).

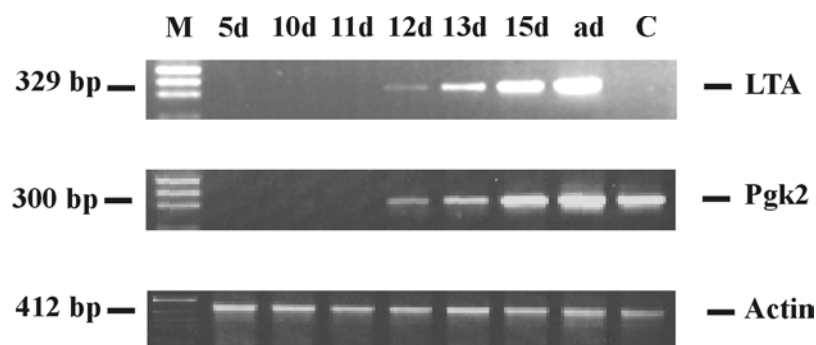


**Abb. 7** Northern Blot-Analysen homozygoter transgener PGK2-LTA Mäuse. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA verschiedener Gewebe der transgenen Linien PL-13, PL-16 und PL-18 wurden im Northern Blot eingesetzt. Für die Hybridisierung wurde eine LTA-spezifische cDNA-Sonde verwendet. Das ca. 2.3 kb große LTA-Transkript konnte nur im Testis detektiert werden. Testikuläre Wildtyp-RNA wurde als Negativkontrolle verwendet (Kontrolle). Zum Nachweis der Integrität der RNA wurden die Northern Blots mit einer hEF cDNA-Sonde rehybridisiert.



### 1.3.2 RT-PCR-Analysen

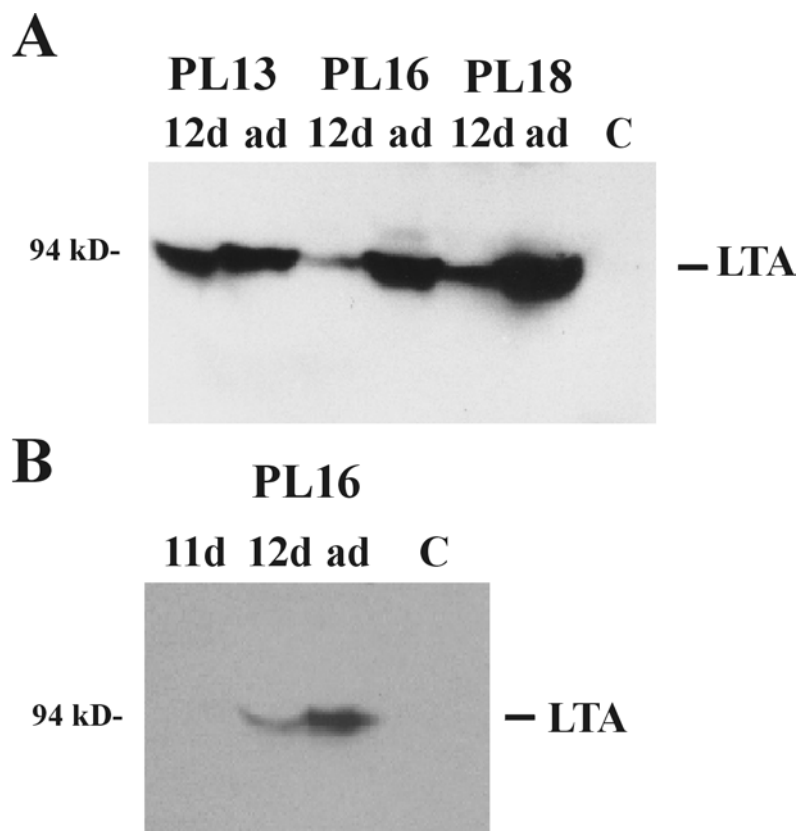
Während der Spermatogenese der Maus treten Spermatozyten erstmals am 10. Tag der postnatalen Entwicklung auf. Zwischen dem 10. und dem 12. Tag befindet sich die Entwicklung der meisten Keimzellen im Stadium der Präleptotänspermatozyten. Zwischen dem 12. und dem 14. Tag treten die ersten Pachytänspermatozyten auf und zwischen dem 20. und 22. Tag treten die ersten Spermatiden auf. Um die Expression von LTA während der postnatalen Entwicklung im Testis zu untersuchen, wurden von der Linie PL 16 verschiedene postnatale Testisstadien präpariert und daraus Gesamt-RNA isoliert. Eine Präparation der Testes erfolgte von 5-, 10-, 12-, 13- und 15 Tage alten sowie adulten transgenen Mäusen der Linie PL 16. Es erfolgte eine RT-PCR mit genspezifischen Primern für LTA (LTA-F und LTA-R2), für das Pgk2-Gen der Maus (Pgk2-F und Pgk2-R) sowie für  $\beta$ -Actin (Act-F und Act-R). Die Untersuchungen ergaben, dass die Transkripte sowohl für das LTA als auch für das endogene Pgk2-Gen erstmals am 12. Tag nachweisbar sind, also im Stadium zwischen den Präleptotän- und den Pachytänspermatozyten (Abb. 8). Die RT-PCR mit den spezifischen Primern für das „housekeeping“-Gen  $\beta$ -Actin belegt die Integrität sämtlicher RNA-Proben (Abb. 8).



**Abb. 8** RT-PCR-Analyse mit testikulärer RNA der PGK2-LTA Mäuse. 500 ng testikuläre Gesamt-RNA wurden jeweils von 5-,10-,12-,13- und 15 Tage alten- sowie adulten transgenen Mäusen der Linie PL-16 für eine RT-PCR eingesetzt, unter Verwendung genspezifischer Primer für LTA und Pgk2. Das Transkript für LTA sowie für das endogene Pgk2 konnte erstmals ab dem 12. Tag detektiert werden. Testikuläre Wildtyp-RNA wurde als Negativkontrolle verwendet. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurde eine RT-PCR mit genspezifischen Primern für  $\beta$ -Actin durchgeführt. (ad=adult; C=Kontrolle; M= DNA-Marker)

### 1.3.3 Western Blot-Analysen

Um das LTA-Protein in den PGK2-LTA transgenen Mäusen spezifisch nachzuweisen, wurden Proteine aus den Testes transgener Mäuse isoliert. Auch hier wurden verschiedene Altersstadien untersucht. Die Präparation erfolgte von 12 Tage alten- und adulten transgenen PGK2-LTA Mäusen aller drei Linien (PL 13, PL 16, PL18). Zusätzlich wurden von der Linie PL 16 die Testes von 11 Tage alten transgenen Mäusen präpariert. Die Proteine wurden isoliert und in einem Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen LTA (Calbiochem) analysiert. Das LTA-Protein konnte in allen drei Linien (PL 13, PL 16 und PL 18) sowohl im 12 Tage alten- als auch im adulten Testis detektiert werden (Abb. 9A). Im 11 Tage alten Testis konnte keine Expression des LTA-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 9B).



**Abb. 9** Western Blot- Analyse unter Verwendung eines LTA-spezifischen Antikörpers.

(A) Testes von 12 Tage alten- und adulten homozygoten PGK2-LTA transgenen Mäusen aller drei Linien (PL 13, PL 16 und PL 18) wurden präpariert und die Proteine isoliert. Die Western Blot-Analyse zeigt die Expression des LTA-Proteins (94kDa) sowohl im 12 Tage alten Testis als auch im adulten Testis. (B) Proteine wurden

von 11- und 12 Tage alten sowie von adulten homozygoten transgenen Mäusen der Linie PL 16 isoliert. Im Western Blot wird das LTA-Protein erstmals ab dem 12. Tag detektiert. Isolierte Proteinextrakte aus Wildtypstestes wurden als Negativkontrolle verwendet (C= Kontrolle).

#### **1.4 Histologische Untersuchungen**

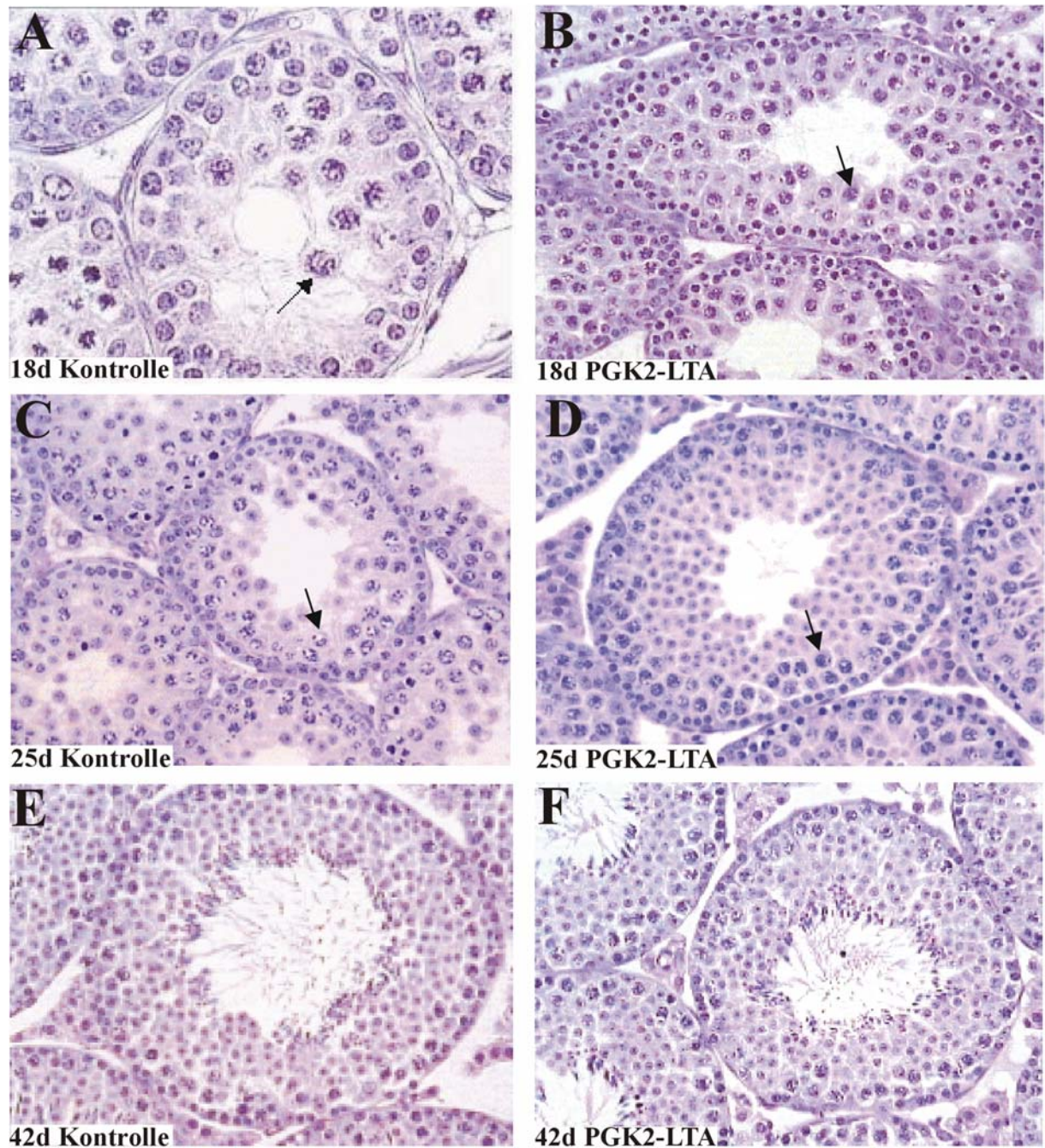
PGK2-LTA transgene Mäuse sind fertil und zeigen äußerlich keine Auffälligkeiten. Auch nach einer Periode von 20 Monaten konnten keine Anzeichen bezüglich einer malignen Transformation im Testis festgestellt werden. Histopathologische Untersuchungen an angefertigten Testisschnitten der PGK2-LTA transgenen Mäuse wiesen diesbezüglich keine Veränderungen im Vergleich zur Wildtypkontrolle auf. Die Untersuchungen wurden in der Abteilung Gastroenteropathologie, Universitätsklinikum Göttingen, von Prof. Dr. L. Füzesi durchgeführt.

#### **1.5 Quantifizierung der Spermatozyten, Spermatischen und Sertoli-Zellen**

Um einen möglichen Einfluss des SV40 large T Antigens auf die Proliferation von Zellen im Testis zu untersuchen, wurden in verschiedenen Altersstadien der homozygoten transgenen Mauslinie PL 16 Pachytänspermatozyten, runde und elongierende Spermatischen sowie Sertoli-Zellen quantifiziert. Als Vergleich dienten dabei jeweils gleichaltrige Wildtypmäuse des Stammes NMRI. Die Testes wurden 48h in Bouin'scher Lösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebunden. Die angefertigten Testisschnitte wurden einer Hämalaun und Eosin Färbung ausgesetzt. Für die Quantifizierung der Pachytänspermatozyten wurden die zu analysierenden Tubuli nach dem Zufallsprinzip ausgezählt. Bei den Spermatischen wurden die elongierenden Spermatischen in Tubuli des Stadiums VI der Spermatogenese gezählt. Für die Quantifizierung von Spermatozyten und elongierenden Spermatischen wurde ein Minimum von 8000-10000 Zellen ausgezählt. Die Sertoli-Zellen wurden nach einer immunhistochemischen Färbung mit einem anti-Vimentin Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg) abgeschätzt. Für die statistische Auswertung wurde der Student's T-test unter Verwendung der FPSF-Software durchgeführt.

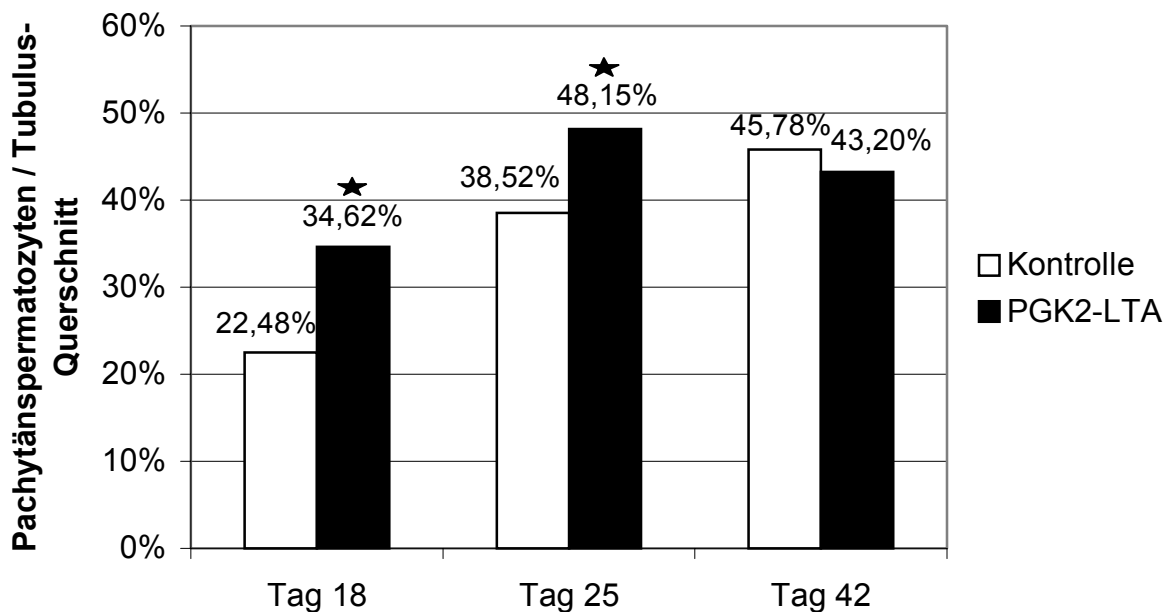
Pachytänspermatozyten wurden in 18-, 25- und 42 Tage alten Mäusen ausgezählt. Dabei zeigten 18 Tage alte transgene Mäuse eine signifikante Erhöhung der Anzahl von Pachytänspermatozyten. Diese war im Vergleich zum Wildtyp um 54% erhöht. Bei 25 Tage alten transgenen Mäusen zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung der Pachytänspermatozyten um 24,9%. Zweiundvierzig Tage alte transgene Mäuse wiesen jedoch keinen Unterschied gegenüber dem Wildtyp auf (Abb. 10A-F, 11). Runde und elongierende Spermatisiden wurden in 42 Tage alten transgenen Mäusen ausgezählt. Dabei zeigte sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Anzahl der Sertoli-Zellen wurde nach einer Anti-Vimentin-Antikörperfärbung in 18- und 42- Tage alten transgenen und Wildtypmäusen bestimmt. Es zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der Sertoli-Zellen zwischen den transgenen und den nichttransgenen Mäusen.

Es lässt sich somit schlussfolgern, dass in den PGK2-LTA transgenen Mäusen während der postnatalen Spermatogenese eine transiente Erhöhung an Spermatozyten vorkommt. Diese assimiliert sich jedoch im weiteren Verlauf der Entwicklung an die Anzahl der Spermatozyten im Wildtypetestis. Von dieser abnorm erhöhten transienten Proliferation sind ausschließlich Spermatozyten betroffen. Andere Zellen wie Spermatisiden und Sertoli-Zellen sind nicht involviert.



**Abb. 10** Hämatoxilin und Eosin-Färbung an Testisschnitten transgener- und Wildtypmäuse im Alter von 18-, 25- und 42 Tagen. **(A, B)** Testisschnitte 18 Tage alter transgener PGK2-LTA- und Wildtypmäuse. Pachytänspermatozyten und Sertoli-Zellen wurden in diesem Stadium quantifiziert. Deutlich sichtbar ist die erhöhte Anzahl an Spermatozyten in der transgenen Maus. **(C, D)** Testisschnitte 25 Tage alter transgener PGK2-LTA- und Wildtypmäuse. In diesem Stadium wurden nur die Pachytänspermatozyten quantifiziert. Deutlich erkennbar ist die erhöhte Anzahl an Pachytänspermatozyten in der transgenen Maus. **(E, F)** Testisschnitte 42 Tage alter transgener- und Wildtypmäuse. In diesem Stadium wurden Pachytänspermatozyten, Sertoli-Zellen und runde bzw. elongierende Spermatisden quantifiziert. Ein quantitativer Unterschied zwischen der transgenen und der Wildtypmaus ist nicht zu erkennen. Sämtliche Abbildungen wurden mit einer 200fachen Endvergrößerung aufgenommen

## Quantifizierung der Spermatozyten

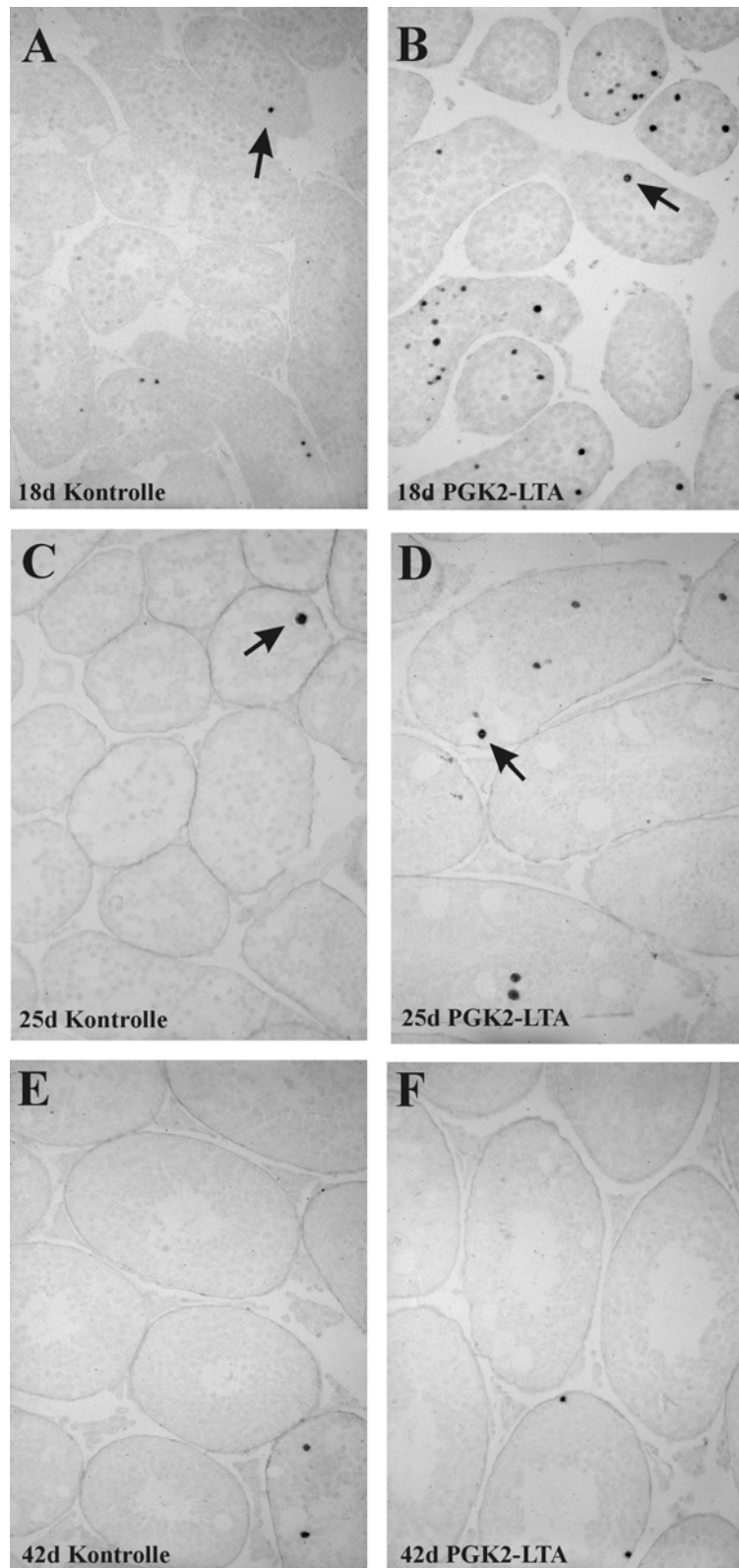


**Abb. 11** Darstellung der relativen Anzahl an Pachytänspermatozyten pro Tubulus in den transgenen PGK2-LTA- und in den Wildtypmäusen verschiedener Altersstadien. Die Anzahl an Pachytänspermatozyten in den 18- und 25 Tage alten transgenen Mäusen ist signifikant höher als die der entsprechenden Wildtypgruppe. Der Stern (\*) markiert einen signifikanten statistischen Unterschied.

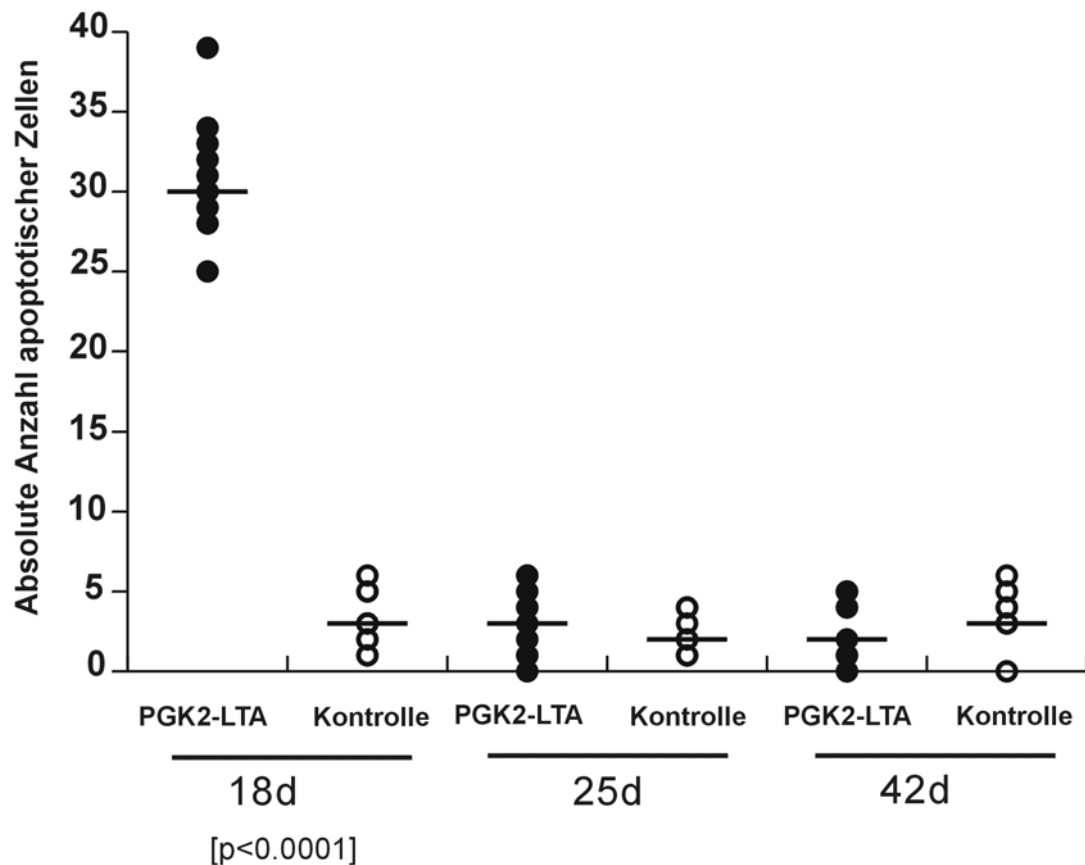
### 1.6 Apoptose-Nachweis an Testisschnitten von PGK2-LTA transgenen Mäusen

Die Quantifizierung der Spermatozyten zeigte eine deutliche, transiente Erhöhung der Spermatozyten in den transgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Um auf eine mögliche Eliminierung der erhöhten Spermatozytenzahl im Verlauf der Spermatogenese durch Apoptose zu prüfen, wurde die ISEL (*in situ*-end labelling)-Methode an Testisschnitten von 18-, 25- und 42 Tage alten transgenen PGK2-LTA Mäusen der Linie PL-16 und jeweils gleichaltrigen Wildtypmäusen des Stammes NMRI durchgeführt. Es wurden jeweils die apoptotischen Zellen in zehn zufällig gewählten „high power fields“ ausgezählt. Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in den 18 Tage alten transgenen Mäusen im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypmäusen. Die 25 Tage alten transgenen Mäuse zeigten keine signifikante Zunahme an apoptotischen Zellen, jedoch waren hier 40% der Werte der transgenen Gruppe über dem absolut höchsten Wert innerhalb der Wildtypgruppe. In 42 Tage

alten transgenen und Wildtypmäusen konnte kein Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen festgestellt werden (Abb. 12A-F, 13).



**Abb. 12** Darstellung ISEL-positiver Zellen an Testisschnitten transgener PGK2-LTA- sowie Wildtypmäusen verschiedener Altersstadien. Sämtliche Abbildungen wurden mit einer 200fachen Endvergrößerung aufgenommen. **(A, B)** Eine große Anzahl apoptotischer Zellen konnte im Testis 18 Tage alter transgener Mäuse beobachtet werden. **(C, D)** In 25 Tage alten transgenen Mäusen nähert sich die Anzahl apoptotischer Zellen der der Wildtypgruppe. **(E, F)** 42 Tage alte transgene Mäuse wiesen keinen Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zum Wildtyp auf. Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen konnte also zwischen den 18 Tage alten transgenen- und Wildtypmäusen beobachtet werden.



**Abb. 13** Grafische Darstellung der quantifizierten apoptotischen Zellen der transgenen- und Wildtypmäuse in den verschiedenen Altersstadien. Ausgezählt wurden die apoptotischen Zellen transgener- und Wildtypmäuse im Alter von 18-, 25- und 42 Tagen, in zehn zufällig ausgewählten „high power fields“. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den apoptotischen Zellen im 18 Tage alten transgenen Testis im Vergleich mit dem 18 Tage alten Wildtypetestis.



## **2. Wiederlegung der publizierten Darstellung, dass das Maus-homologe 135-kDa- $\alpha$ -D-Mannosidase (MAN2B2)-Gen testis- und spermatogonien-spezifisch exprimiert wird**

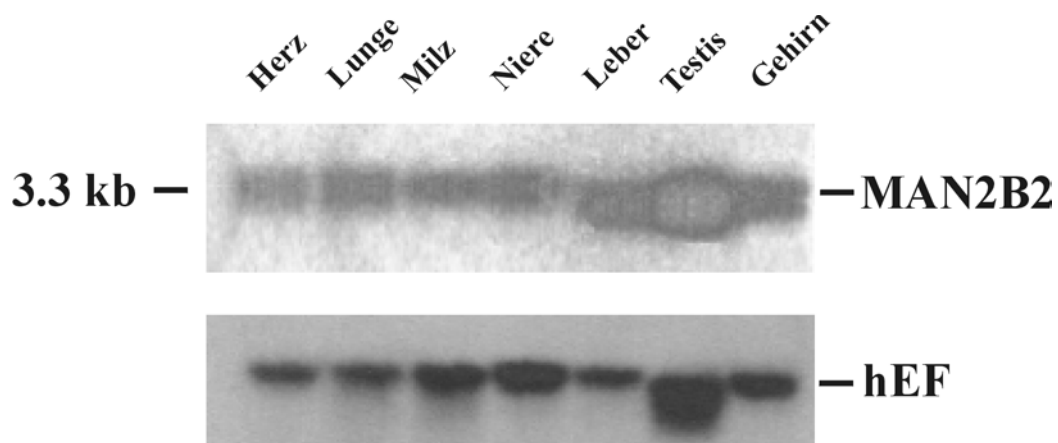
### **2.1 Hintergrund**

In dem publizierten Artikel „Stage-specific expression of a mouse homologue of the porcine 135 kDa  $\alpha$ -D-mannosidase (MAN2B2) in type A spermatogonia”, (Hiramoto et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 241, 439-445) wurde das Maus-homologe MAN2B2-Gen als testis- und spermatogonien-spezifisch deklariert. Northern Blot-Analysen mit jeweils 5  $\mu$ g Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der Maus und unter Verwendung einer DIG-markierten Oligonukleotidsonde zeigten eine Expression des Maus-homologen MAN2B2-Gens ausschließlich im Testis und in keinem weiteren Gewebe. Eine *in situ*-Hybridisierung an Testisschnitten, die wiederum unter Verwendung einer DIG-markierten Oligonukleotidsonde durchgeführt wurde, lokalisierte das Maus-homologe MAN2B2-Transkript in Spermatogonien des Typs A. Aufgrund dieses angegebenen Expressionsmusters war der Promotor des MAN2B2-Gens von Interesse, da dieser für die ektopische Expression des SV40 large T Antigen in den Spermatogonien hätte verwendet werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster des Gens kontrolliert.

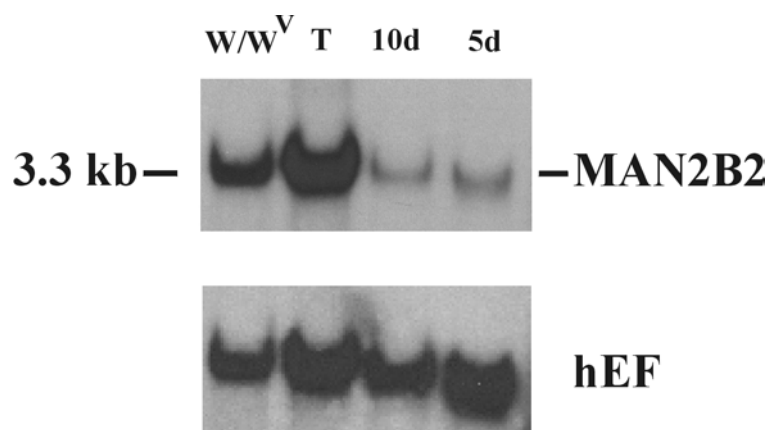
### **2.2 Expressionsanalyse des Maus-homologen MAN2B2-Gens**

Die Expressionsanalyse wurde mittels Northern Blots durchgeführt. Es wurde je 20  $\mu$ g Gesamt-RNA aus den Geweben Milz, Herz, Niere, Leber, Gehirn, Lunge und Testis der Maus verwendet. Als radioaktiv markierte Sonde wurde die komplette MAN2B2 cDNA der Maus (3.3 kb) verwendet. Im Gegensatz zu den publizierten Daten konnte ein ca. 3.3 kb großes, ubiquitär exprimiertes MAN2B2-Transkript detektiert werden (Abb. 14). Die Integrität der RNA wurde durch eine Rehybridisierung des Northern Blots mit dem ubiquitär-exprimierten humanen Elongationsfaktor (hEF) belegt.

Um die Expression des MAN2B2-Gens während der testikulären Entwicklung zu untersuchen, wurden 20 µg testikuläre Gesamt-RNA von 5 Tage alten-, 10 Tage alten- und adulten Mäusen sowie testikuläre RNA von W/W<sup>V</sup>-Mäusen für einen Northern Blot verwendet. Dieser wurde mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde für MAN2B2 hybridisiert. Auch hier wurde das ca. 3.3 kb große MAN2B2 Transkript ubiquitär detektiert (Abb. 15). Die Tatsache, dass das Transkript in testikulärer RNA von W/W<sup>V</sup>-Mäusen sowie in sämtlichen analysierten Geweben detektiert wird, zeigt eindeutig, dass das Maus-homologe MAN2B2-Gen kein keimzellspezifisches Gen ist (Tascou et al., 2000). Damit konnte der Promotor des Maus-homologen MAN2B2-Gens nicht für die Herstellung eines spermatogonien-spezifisch exprimierten LTA-Gens verwendet werden.



**Abb. 14** Northern Blot-Analyse mit jeweils 20 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen der Maus, unter Verwendung einer spezifischen Maus-MAN2B2 cDNA Sonde. Ein Transkript von ca. 3.3 kb konnte in jedem Gewebe detektiert werden. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurde der Northern Blot mit einer hEF cDNA Sonde rehybridisiert.



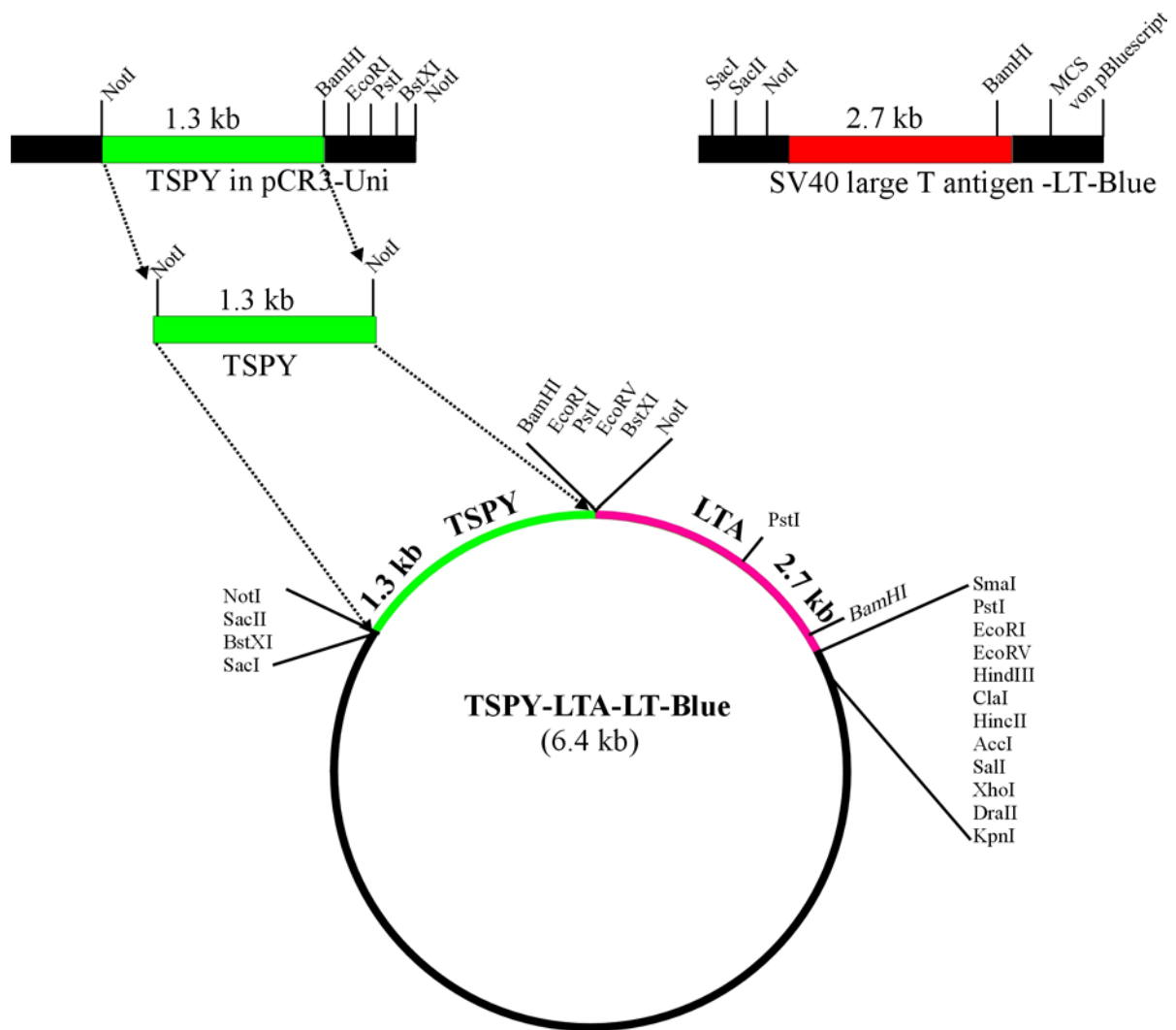
**Abb. 15** Northern Blot-Analyse mit je 20 µg testikulärer Gesamt-RNA von 5 Tage alten-, 10 Tage alten- und adulten Mäusen und mit testikulärer RNA der W/W<sup>v</sup>-Mutante. Für die Hybridisierung wurde eine spezifische MAN2B2 cDNA Sonde verwendet. Ein Transkript von ca. 3.3 kb konnte in jedem analysierten Gewebe detektiert werden. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurde der Northern Blot mit einer hEF cDNA Sonde rehybridisiert. (T= adulte testikuläre RNA)

### 3. TSPY-LTA transgene Mäuse

Im Rahmen des *in vivo* Ansatzes sollten transgene Mäuse generiert werden, die das LTA stadienspezifisch in den Spermato gonien exprimieren. Untersucht werden sollte, ob Spermato gonien die Potenz zur malignen Transformation besitzen. Zu diesem Zweck wurde das SV40 large T Antigen an eine 1.3 kb lange 5'-flankierende Sequenz des humanen TSPY-Gens (testis-specific protein, Y-encoded) gekoppelt. Die Aktivität dieser TSPY-Promotorregion wurde zuvor unter Verwendung eines CAT-Reportergens in verschiedenen Zelllinien ausgetestet (III. 4.5). Das TSPY-Gen ist beim Menschen auf dem Y-Chromosom lokalisiert und wird ausschließlich im Testis exprimiert. Antikörperfärbungen an Testisschnitten zeigen eine spezifische Expression von TSPY in Spermato gonien (Schnieders et al., 1996).

#### 3.1 Herstellung eines TSPY-LTA Konstruktes

Eine 1.3 kb große 5'-flankierende Sequenz des humanen TSPY-Gens wurde aus dem Plasmid TSPY-pCR3-Uni mit *NotI* herausgeschnitten. Parallel wurde das LT-Blue Plasmid, welches das LTA enthält, mit *NotI* linearisiert. Die TSPY-Promotorregion wurde anschließend isoliert und in das *NotI* linearisierte LT-Blue-Plasmid ligiert (Abb. 16). Um die korrekte Orientierung zu überprüfen, wurde das Konstrukt TSPY-LTA-LT-Blue sequenziert. Anschließend wurde es für die Mikroinjektion vorbereitet. Die 1.3 kb lange 5'-flankierende Sequenz des TSPY-Gens wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. Schmidtke, Institut für Humangenetik Hannover, zur Verfügung gestellt.

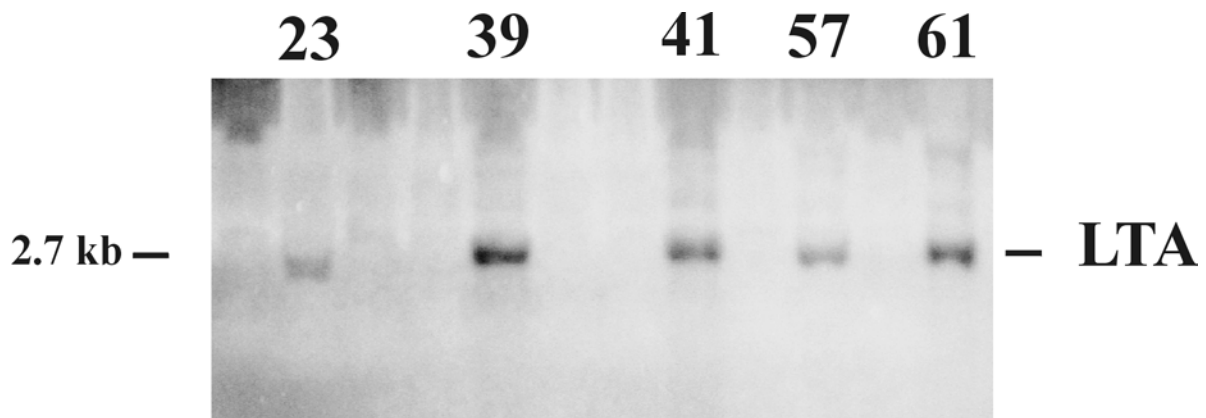


**Abb. 16** Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des TSPY-LTA (TSPY-LTA-LT-Blue) Konstruktes. Die 1.3 kb große 5'-flankierende Sequenz des humanen TSPY-Gens wurde mit *NotI* aus dem Plasmid TSPY-pCR3-Uni isoliert. Parallel wurde das LT-Blue-Plasmid mit *NotI* geschnitten. Anschließend wurde die isolierte TSPY-Promotorregion in das zuvor mit *NotI* linearisierte LT-Blue-Plasmid ligiert.

### 3.2 Erzeugung transgener TSPY-LTA Mäuse

Die Erzeugung transgener TSPY-LTA Mäuse wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Medizin, Göttingen, durchgeführt. Das oben beschriebene Konstrukt TSPY-LTA wurde in den männlichen Vorkern befruchteter Oozyten injiziert. Die mikroinjizierten Oozyten wurden anschließend in die Eileiter scheinsschwangerer Mäuse retransferiert. Insgesamt wurden 105 Nachkommen geboren. Diese wurden im Alter von 21 Tagen auf Transgenität untersucht.

Dafür wurden PCR- und Southern Blot-Experimente durchgeführt. Insgesamt konnten 5 Foundertiere (Foundertier Nr. 23, Nr. 39, Nr. 41, Nr. 57 und Nr. 61) über PCR- und Southern Blot-Analysen als transgen identifiziert werden (Abb. 17). Die positiven Foundertiere wurden im Alter von 56 Tagen mit Wildtypmäusen des Stammes FVB verpaart. Die Nachkommen wurden auf Transgenität analysiert und mit heterozygoten F1-Tieren verpaart, um homozygote Linien aufzubauen.



**Abb. 17** Southern Blot-Analyse der identifizierten Foundertiere. Je 20 µg isolierte genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurde mit *EcoRI* restringiert und im Southern Blot mit einer LTA-spezifischen cDNA Sonde hybridisiert. Alle Foundertiere zeigten das charakteristische Hybridisierungssignal von LTA bei 2.7 kb.

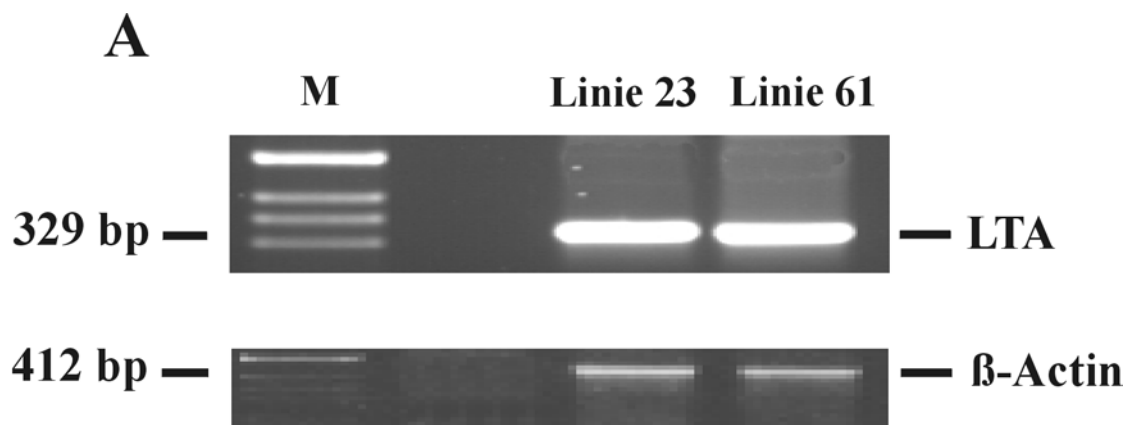
### 3.3 Analyse der F1-Generation

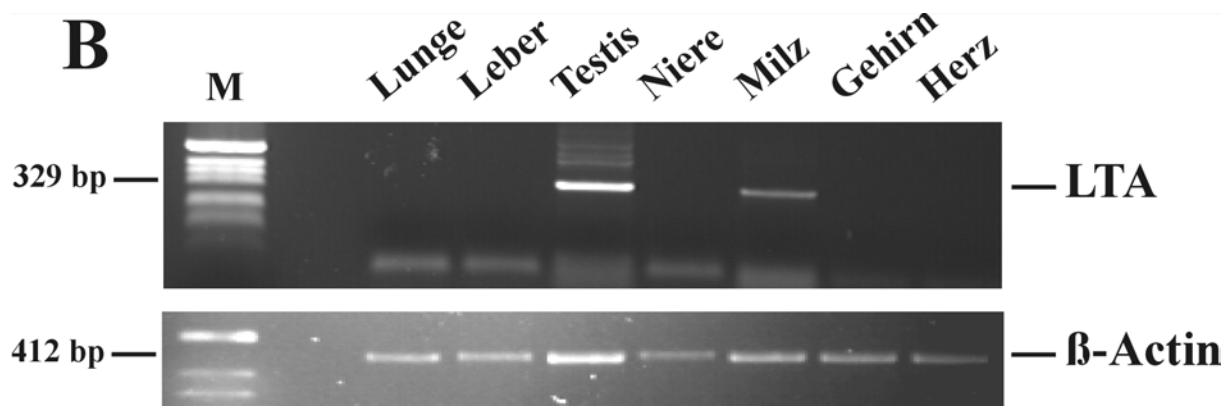
Bei der Linie 23 wurden transgene Nachkommen in der F1-Generation geboren. Darüber hinaus konnte bei der Linie 23 eine Expression von LTA über RT-PCR nachgewiesen werden (III. 3.4). Das Foundertier dieser Linie starb im Alter von 3 Monaten an ungeklärter Ursache. Bei der Linie 39 konnten keine transgenen Nachkommen identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass der weibliche Founder 39 das Transgen nicht in die Keimbahn aufgenommen hat. Der weibliche Founder 41 zeichnete sich durch einen sogenannten „Drehwurm“ aus. Dabei weist das Tier motorische Störungen auf. Dieses Syndrom tritt bei Mäusen des Stammes FVB relativ häufig auf und ist unabhängig von der Transgenität des Tieres. Bei dieser Linie wurden keine Nachkommen geboren. Der weibliche Founder 57 ist bis zum Alter von 118 Tagen nicht trächtig geworden. Danach setzten bei diesem Tier starke äußerliche Veränderungen ein. Das Tier zeigte extrem starke Gleichgewichtsstörungen, allgemein schlechtes und

krankhaftes Aussehen sowie Reflexstörungen und allgemeine Schwäche. Von diesem Tier wurden keine Nachkommen geboren. Bei der Linie 61 wurden transgene Nachkommen in der F1-Generation geboren. Außerdem konnte auch bei dieser Linie eine Expression von LTA nachgewiesen werden (III. 3.4).

### 3.4 Expressionsanalyse für LTA

Von jeweils einer männlichen hemizygoten transgenen Maus der Linie 23 und der Linie 61 wurden die Testes im adulten Alter präpariert und Gesamt-RNA isoliert. Jeweils 2 µg Gesamt-RNA wurden unter Verwendung genspezifischer Primer für LTA (LTA-F und LTA-R1) in einer RT-PCR Reaktion eingesetzt. Bei beiden Linien konnte eine Expression von LTA im Testis nachgewiesen werden (Abb. 18A). Darüber hinaus wurde von einer 25 Tage alten hemizygoten männlichen Maus der Linie 23 Gesamt-RNA aus den Organen Herz, Leber Niere, Testis, Lunge, Milz und Gehirn isoliert. Jeweils 2 µg Gesamt-RNA wurden unter Verwendung genspezifischer Primer für LTA (LTA-F und LTA-R1) in einer RT-PCR Reaktion eingesetzt. Dabei zeigte sich neben der Expression von LTA im Testis auch eine Expression in der Milz (Abb. 18B). Zur Überprüfung der Integrität der RNA wurde eine RT-PCR mit spezifischen Primern für  $\beta$ -Actin durchgeführt.

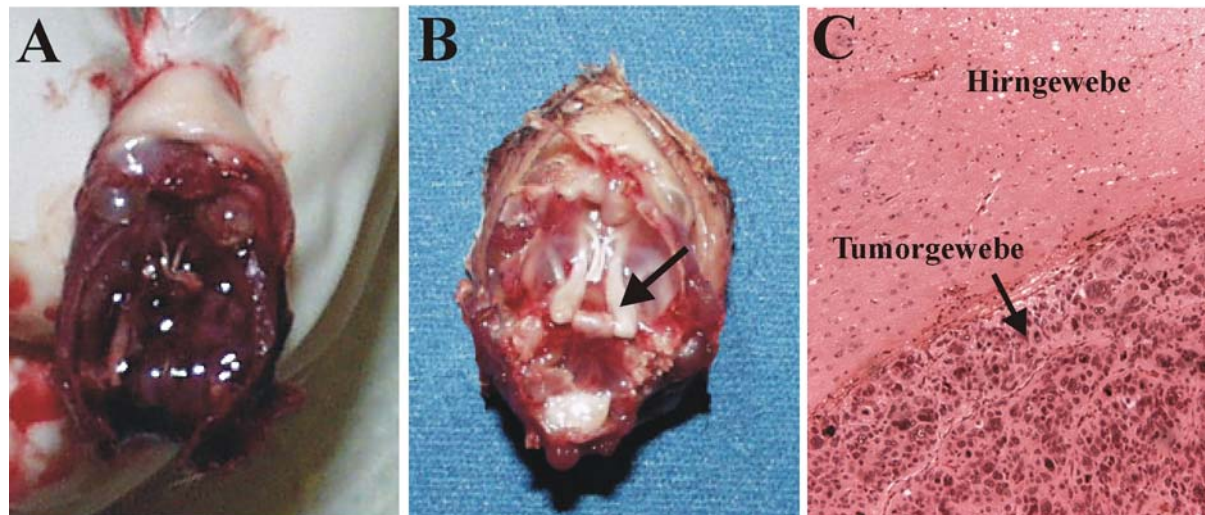




**Abb. 18** (A). Hemizygot adulte transgene Mäuse der Linien 23 und 61 wurden auf eine LTA-Expression im Testis überprüft. RT-PCR-Analysen unter Verwendung von genspezifischen Primern für LTA detektierten das LTA-Fragment von 329 bp in testikulärer RNA der Linie 23 und der Linie 61. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurde eine RT-PCR mit genspezifischen Primern für  $\beta$ -Actin durchgeführt. (B) RT-PCR-Analyse an isolierter Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen einer 25 Tage alten hemizygoten TSPY-LTA transgenen Maus (Linie 23). Das spezifische LTA-Fragment von 329 bp konnte im Testis und in der Milz detektiert werden. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurde eine RT-PCR mit genspezifischen Primern für  $\beta$ -Actin durchgeführt.

### 3.5 Ausbildung von Tumoren bei den TSPY-LTA transgenen Mäusen

Bei den TSPY-LTA transgenen Mäusen besteht die Möglichkeit, dass sich die Expression des LTA unter der Kontrolle des TSPY-Promotors postnatal im Alter von 3-4 Monaten letal auswirkt. Bei der Linie 23 zeigten insgesamt 4 männliche und 3 weibliche hemizygot Mäuse und bei der Linie 57 zeigte das weibliche Foundertier im Alter von 3-4 Monaten ausgeprägte Gleichgewichtsstörungen, Reflexstörungen und Abmagerung. Charakteristisch war weiterhin, dass sich bei sämtlichen Tieren im fortgeschrittenen Krankheitsstadium eine Augenauffektion fand. Insgesamt waren fünf transgene Mäuse in zwei unabhängigen Linien (Linie 23 und Linie 57) betroffen, die diese Symptome aufwiesen. Die Tiere wurden kurz vor dem absehbaren Tode abgetötet und die Gewebe fixiert. Nach dem Öffnen der Schädeldecke und dem umsichtigen Ausheben des Gehirns, zeigte sich bei allen Tieren eine Tumormasse in der Sella turcica (Abb. 19A-C). Diese Tumoren werden derzeit in Zusammenarbeit mit Dr. Schulz-Schaeffer, Abt. Neuropathologie, Universitätsklinikum Göttingen, weiterführend charakterisiert. Tumoren im Testis oder anderen Organen konnten nicht gefunden werden.



**Abb. 19** (A) Bei den transgenen Mäusen bildeten sich Tumoren in der Sella turcica. Nach dem umsichtigen Entfernen des Gehirns konnte dort ein Tumor isoliert werden. Deutlich erkennbar ist der Ascites, eine Hypophysenstruktur war nicht mehr zu erkennen. (B) Darstellung der Hypophyse einer normalen Wildtypmaus. (C) Darstellung eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Tumors mit anliegendem Hirngewebe. Der Tumor wurde aus einer transgenen TSPY-LTA Maus isoliert (200fache Endvergrößerung).

#### **4. Etablierung einer immortalisierten Spermatozytenzelllinie GC-4spc mit Hilfe des Promotor-basierten Selektionsverfahrens**

##### **4.1 Herstellung der Konstrukte**

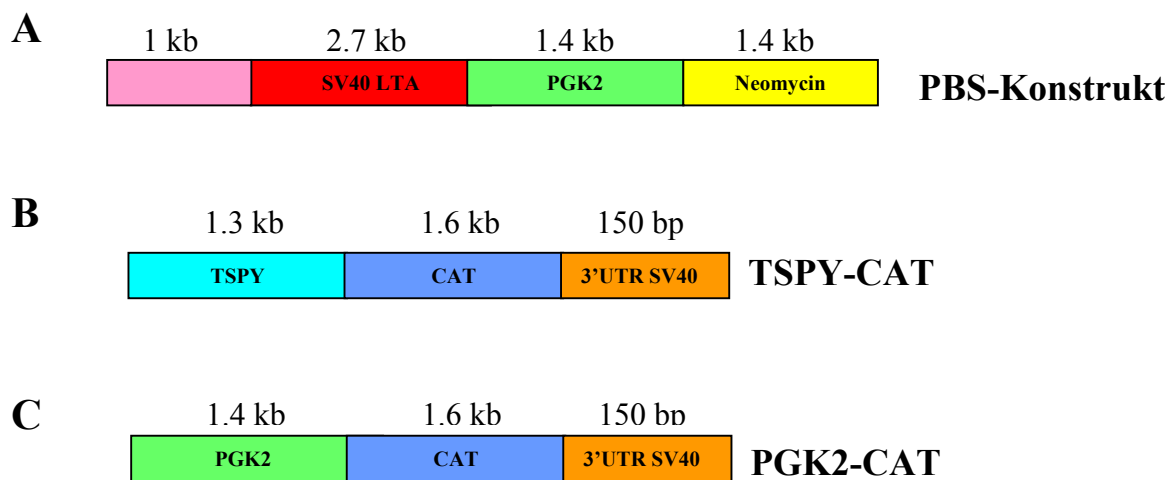
Promotorselektionskonstrukt für die stabile Transfektion

Das Promotor-basierte Selektionskonstrukt (PBS) besteht aus dem 2.7 kb großen SV40 large T Antigen unter der Kontrolle des 1 kb großen SV40 Promotors und Enhancers und dem 1.4 kb großen Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des humanen, 1.4 kb großen Phosphoglycerat-Kinase2 (PGK2)-Promotors (Abb. 20A). Für die Herstellung des Konstruktes wurde der Thymidin Kinase (TK)-Promotor aus dem pMSVLT-Vektor (Schuermann et al., 1990) mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BglII* herausgeschnitten und durch den 1.4 kb großen PGK2-Promotor ersetzt. Der PGK2-Promotor wurde vorab mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BglII* aus dem PGK2-CAT –Konstrukt isoliert (Robinson et al., 1989).



#### Promotorkonstrukte für transiente Transfektionen

Zur Herstellung des TSPY-CAT-Konstruktes wurde die 1.3 kb große TSPY-Promotorregion mit *SmaI* aus dem pCR3-Uni-Plasmid herausgeschnitten und entsprechend in den pCAT3-Basic-Vektor (Promega, Madison, WI) inkloniert (Abb. 20B). Die 1.3 kb große 5'-flankierende Sequenz des humanen TSPY-Gens wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. Schmidtke, Institut für Humangenetik, Hannover, zur Verfügung gestellt. Das PGK2-CAT-Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. R. P. Erickson, University of Arizona, USA, zur Verfügung gestellt (Abb. 20C).



**Abb. 20** Darstellung der verwendeten Konstrukte. **(A)** Das Promotor-basierte Selektionskonstrukt (PBS) wurde für die stabile Transfektion zur Etablierung der GC-4spc Zelllinie verwendet. Es besteht aus dem SV40 large T Antigen, das unter der Kontrolle des SV40 Promotors und Enhancers steht sowie dem Neomycin-Resistenzgen, das unter der Kontrolle des humanen PGK2-Promotors steht. **(B)** Das für Promotorstudien verwendete PGK2-CAT Konstrukt besteht aus einer 1.4 kb großen 5'-flankierenden Sequenz des humanen PGK2-Gens sowie dem CAT-Reportergen. **(C)** Das für Promotorstudien verwendete TSPY-CAT Konstrukt besteht aus einer 1.3 kb großen 5'-flankierenden Sequenz des humanen TSPY-Gens sowie dem CAT-Reportergen.

#### 4.2 Etablierung der immortalisierten Spermatozytenzelllinie GC-4spc

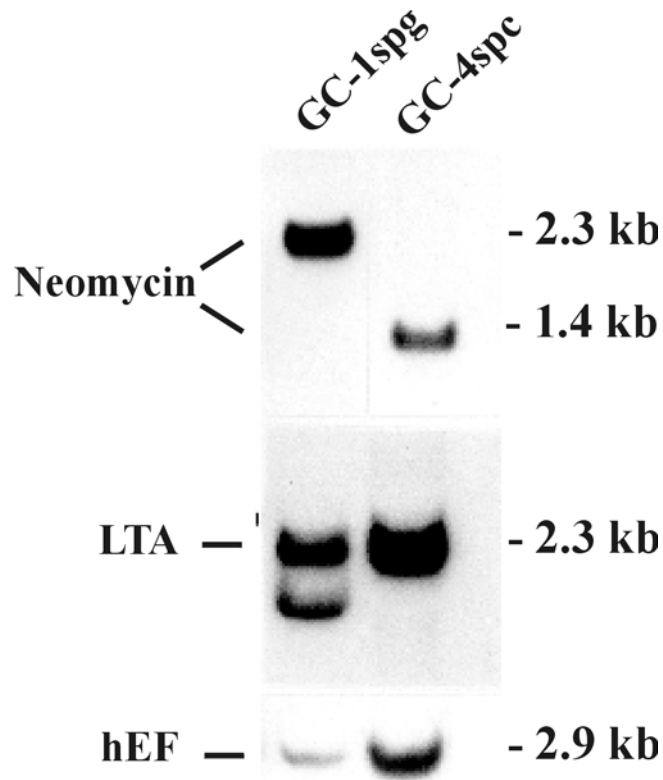
Fünf bis sechs Testes von adulten männlichen Mäusen der transgenen Linie TC (Nayernia et al., 1994) wurden dekapsuliert und gemäß (II.11.3) behandelt. Die transgene Mauslinie TC exprimiert das CAT-Reportergen unter der Kontrolle eines trunkierten Proakrosin-Promotors. Aus den isolierten Zellen wurde eine Primärkultur angelegt. Diese wurde mit dem Promotor-basierten Selektionskonstrukt (Abb. 20A) transfiziert. Nach 36 Tagen wurde durch die Zugabe von G418 in einer Konzentration von 200 µg/ml die Selektion der Zellen angeregt. In wöchentlichen Intervallen wurde das Selektionsnährmedium gewechselt bis stabile Kolonien isoliert werden konnten. Diese wurden dann in normalem Medium für eukaryotische Zellen weiterkultiviert. Das Promotor-basierte Selektionsverfahren funktioniert nach dem Prinzip, dass nach der Transfektion der Primärkultur zunächst sämtliche Zellen durch das SV40 large T Antigen, das unter der Kontrolle des ubiquitär-aktiven SV40 Promotors steht, immortalisiert werden. Nach Zugabe des Antibiotikums beginnt die eigentliche Selektion. Denn nur solche Zellen sind gegen das Antibiotikum resistent, in denen der Promotor des Resistenzgens aktiv ist. In diesem Fall handelt es sich um den 1.4 kb großen humanen PGK2-Promotor. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das PGK2-Gen bei der Maus und beim Menschen keimzellspezifisch in den Spermatozyten exprimiert wird (Robinson et al., 1989, McCarrey et al., 1992, 1996). Darüber hinaus zeigten Promotorstudien, dass die hier verwendete 1.4 kb große 5'-flankierende Sequenz des humanen PGK2-Gens ausreichend ist für eine *in vivo* Aktivierung eines CAT-Reportergens (Robinson et al., 1989). In der durchgeführten Prozedur überlebten demnach ausschließlich Spermatozyten die Selektion.

Die GC-4spc Zellen wachsen adhärent und wurden bereits für mehr als 30 Generationen kultiviert. Southern Blot-Analysen unter Verwendung von isolierter genomischer DNA aus GC-4spc Zellen und einer spezifischen LTA- bzw. Neomycin cDNA Sonde zeigten eine Aufnahme des Konstruktes ins Genom der Zellen. Chromosomale Analysen wiesen einen diploiden DNA-Gehalt nach. Dies ist gleichzeitig ein Beleg dafür, dass die GC-4spc Zelllinie *in vitro* nicht weiter differenziert. Die chromosomalen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Schmid, Institut für Humangenetik, Würzburg, durchgeführt. Für die nachfolgenden Experimente wurde die immortalisierte GC-1spg Zelllinie zum Vergleich analysiert. Die GC-1spg Zelllinie wurde von Hofmann et al. (1992) hergestellt und wurde ebenfalls mit dem SV40

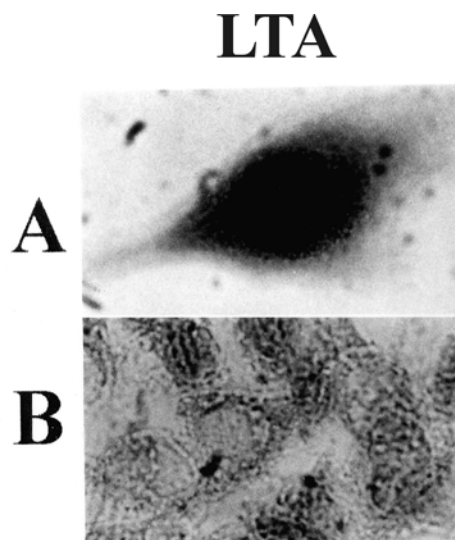
large T Antigen immortalisiert. Morphologisch repräsentiert sie ein Stadium zwischen den Spermatogonien des Typs B und den Präleptotänspermatozyten.

#### **4.3 Expressionsanalyse für Neomycin und SV40 large T Antigen in GC-1spg- und in GC-4spc -Zellen**

Jeweils 20 µg Gesamt-RNA von GC-1spg- und GC-4spc Zellen wurden in einer Northern Blot –Analyse eingesetzt. Dabei wurde jeweils mit einer Neomycin-spezifischen- und mit einer LTA-spezifischen cDNA Sonde hybridisiert. Bei der GC-4spc Zelllinie konnte das erwartete 1.4 kb große Neomycin-Transkript detektiert werden (Abb. 21). Dieses Ergebnis beweist die Aktivität der verwendeten 1.4 kb großen 5'-flankierenden Region des humanen PGK2-Gens in der GC-4spc Zelllinie. Bei der GC-1spg Zelllinie hingegen konnte ein 2.3 kb großes Neomycin-Transkript detektiert werden. Die Diskrepanz zwischen den erhaltenen Transkriptgrößen könnte auf das Vorhandensein unterschiedlicher Transkriptionsstartpunkte bzw. unterschiedlicher Polyadenylierungssignale zurückzuführen sein. Darüber hinaus ist es aber auch möglich, dass es sich hierbei um ein Fusionstranskript handelt, da Informationen zum Integrationsort des Neomycin-Gens in den GC-1spg Zellen unbekannt sind. Das ungefähr 2.3 kb große LTA-Transkript konnte in beiden Zelllinien detektiert werden (Abb. 21). Zum Nachweis der Integrität der RNA wurden die Northern Blots mit einer hEF cDNA Sonde rehybridisiert. Die GC-4spc Zellen wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen SV40 LTA Antikörper analysiert (Calbiochem), wobei eine spezifische Färbung in der GC-4spc –Zelllinie beobachtet werden konnte. Als Negativkontrolle wurden die GC-4spc Zellen ohne den primären Antikörper behandelt (Abb. 22).



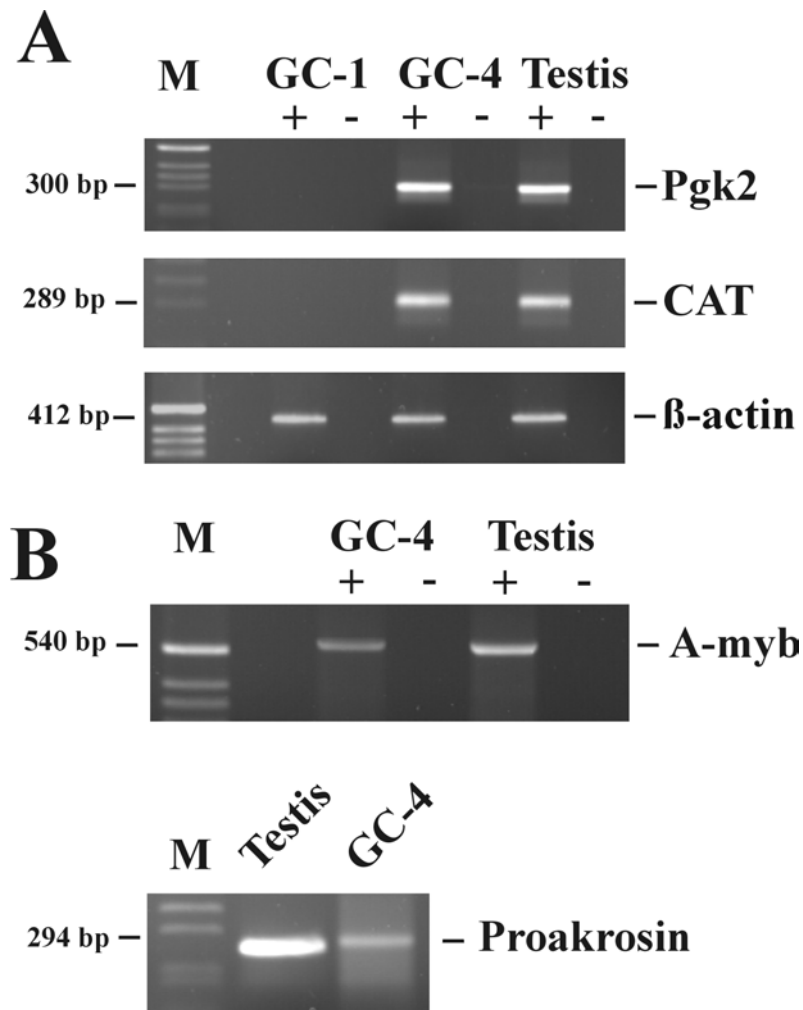
**Abb. 21** Northern Blot -Analyse unter Verwendung von jeweils 20 µg Gesamt-RNA aus der GC-1spg- und der GC-4spc Zelllinie. Hybridisiert wurde mit einer spezifischen Neomycin- bzw. LTA- cDNA Sonde. In der GC-1spg Zelllinie konnte ein ca. 2.3 kb großes- und in der GC-4spc Zelllinie ein ungefähr 1.4 kb großes Neomycin-Transkript detektiert werden. Ein LTA-Transkript von ca. 2.3 kb konnte in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurden die Northern Blots mit einer spezifischen hEF cDNA-Sonde rehybridisiert.



**Abb. 22** Immunhistochemische Färbung der GC-4 Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das SV40 large T Antigen. **(A)** Eine spezifische Färbung konnte in GC-4spc Zellen beobachtet werden. **(B)** Als Negativkontrolle wurden GC-4spc Zellen der gleichen Prozedur unterzogen, ohne jedoch den primären Antikörper zu verwenden.

#### 4.4 Expression keimzellspezifischer Marker in der GC-4spc Zelllinie

Für eine detaillierte Charakterisierung der Stadienspezifität der GC-4spc Zelllinie wurden Expressionsanalysen hinsichtlich spezieller Markergene für Spermatozyten durchgeführt. RT-PCR-Analysen an isolierter GC-1spg und GC-4spc Gesamt-RNA unter Verwendung genspezifischer Primer zeigten ein Transkript für das endogene Pgc2 –Gen der Maus und für das CAT-Reporter-gen in GC-4spc RNA. In GC-1spg RNA konnten keine Produkte amplifiziert werden (Abb. 23A). Während der Spermatogenese der Maus wird das Pgc2-Gen der Maus ab dem 12. Tag im Stadium der Präleptotänspermatozyten exprimiert (McCarrey et al., 1992). In der transgenen Mauslinie TC konnte das erste CAT-Transkript, das unter der Kontrolle eines trunkierten Proakrosinpromotors steht, über RT-PCR im Testis 15 Tage alter Mäuse detektiert werden (Nayernia et al., 1994). Darüber hinaus konnten über RT-PCR-Analysen Transkripte für Proakrosin und A-myb nachgewiesen werden. Für die Analyse wurde 1 µg GC-4spc PolyA<sup>+</sup>-RNA als Template und genspezifische Primer verwendet (Abb. 23B). Proakrosin wird während der Spermatogenese der Maus ab dem 15. Tag im Testis transkribiert und zwar im Stadium der Pachytänspermatozyten (Nayernia et al., 1994). Das A-myb-Gen wird keimzellspezifisch exprimiert und konnte in Spermatozyten und primären Spermatozyten nachgewiesen werden (Latham et al., 1996). Aufgrund der Expression der spezifischen Markergene repräsentiert die immortalisierte GC-4spc Zelllinie ein Entwicklungsstadium zwischen den Präleptotänspermatozyten und den frühen Pachytänspermatozyten.



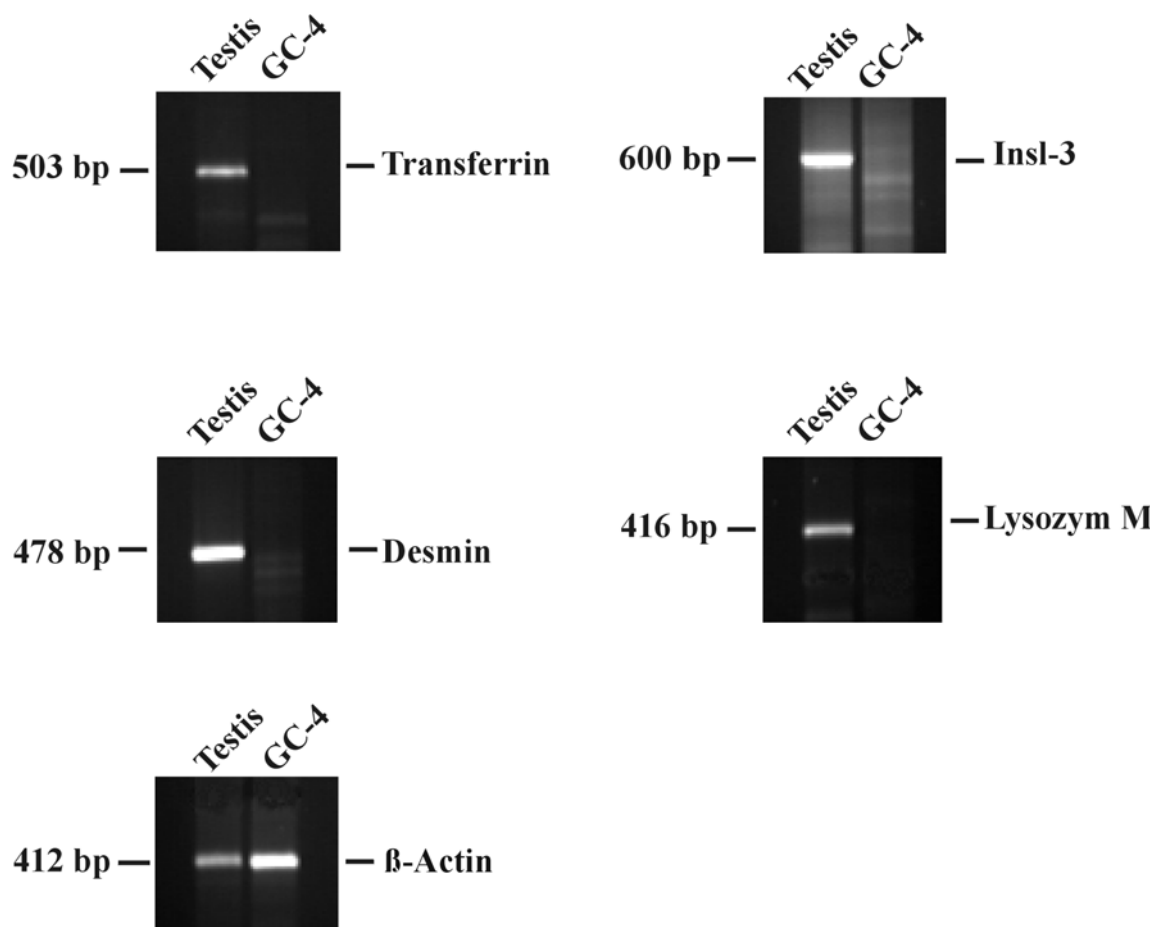
**Abb. 23** Expressionsnachweis von Pgk2, CAT, A-myb und Proakrosin über RT-PCR an isolierter RNA der GC-4spc Zelllinie bzw. an testikulärer RNA adulter Akrosin-CAT transgener Mäuse (TC-Mäuse). Um eine mögliche DNA-Kontamination auszuschließen, wurden die Reaktionen mit Reverser-Transkriptase (+) und ohne Reverse-Transkriptase durchgeführt (-). **(A)** Amplifikationen von Pgk2 und CAT mRNAs konnten in testikulärer RNA der transgenen Mauslinie TC sowie in RNAs der GC-4spc Zelllinie beobachtet werden. Keine Transkription konnte in der GC-1spc Zelllinie nachgewiesen werden. **(B)** Amplifikation mittels RT-PCR von A-myb und Proakrosin unter Verwendung von GC-4spc PolyA<sup>+</sup>-RNA bzw. testikulärer Wildtyp-RNA als Kontrolle. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurde eine RT-PCR mit genspezifischen Primern für β-Actin durchgeführt.

Um nachzuweisen, dass die GC-4spc Zellen nicht mit anderen Zelltypen im Testis wie, z.B. Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen, Makrophagen oder Peritubular-Zellen kontaminiert sind, wurden RT-PCR-Analysen mit genspezifischen Primern für typische Marker der o.g. Zellen durchgeführt (Tab. 3).

Zelltyp	Analysiertes Markergen
Sertoli-Zellen	Transferrin (Idzerda et al., 1989)
Leydig-Zellen	Insl-3 (Zimmermann et al., 1997)
Peritubular-Zellen	Desmin (Hofmann et al., 1992)
Makrophagen	Lysozym M (Cross et al., 1988)

**Tab. 3** Darstellung der verwendeten Markergene, um auf eine mögliche Kontamination der GC-4spc Spermatozytenzelllinie mit anderen Zelltypen zu prüfen.

In keiner durchgeführten RT-PCR-Reaktion konnte ein Amplifikat der in Tabelle 3 aufgeführten Markergene in GC-4spc RNA erhalten werden (Abb. 24). Als Positivkontrolle wurde jeweils adulte testikuläre RNA verwendet. Dieses Ergebnis zeigt, dass die GC-4spc Zelllinie nicht mit den o.g. Zellen kontaminiert ist, sondern einer reinen Spermatozytenkultur *in vitro* entspricht.

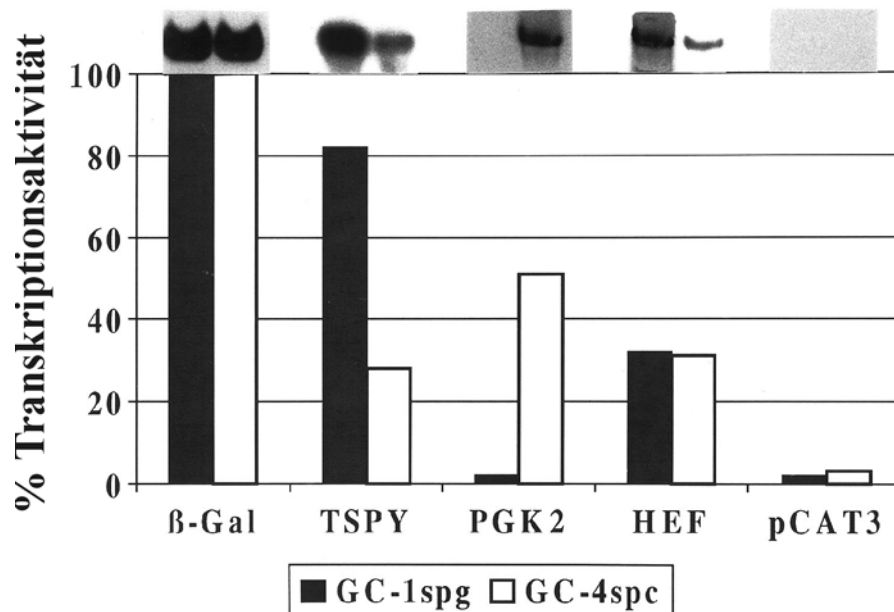


**Abb. 24** RT-PCR-Expressionsanalyse der Markergene Transferrin (Sertoli-Zellen), Insl-3 (Leydig-Zellen), Desmin (Peritubular-Zellen) und Lysozym M (Makrophagen) in GC-4spc unter Verwendung von 2 µg isolierter GC-4spc Gesamt-RNA. Testikuläre Wildtyp -RNA wurde dabei als Positivkontrolle verwendet. In der GC-4spc RNA konnten keine Transkripte der Markergene detektiert werden. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurde eine RT-PCR mit genspezifischen Primern für  $\beta$ -Actin durchgeführt.

#### **4.5 Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität keimzellspezifischer Promotoren in der GC-4spc- und in der GC-1spg- Zelllinie**

Um die transkriptionelle Aktivität verschiedener keimzellspezifischer Promotoren in der GC-4spc und GC-1spg-Zelllinie zu testen, wurden die Zellen mit einem TSPY-CAT- bzw. mit einem PGK2-CAT Konstrukt transient transfiziert. Eine endogene CAT-Transkription konnte in der GC-4spc Zelllinie in Vorexperimenten nur über RT-PCR nachgewiesen werden, jedoch nicht im Northern Blot. Das humane TSPY-Gen wird testisspezifisch exprimiert, eine Expression konnte vornehmlich in Spermatogonien und in geringen Mengen in primären Spermatozyten nachgewiesen werden (Schnieders et al., 1996). Achtundvierzig Stunden nach der durchgeführten Transfektion wurde aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert und im Northern Blot auf eine CAT-Expression untersucht. Anschließend folgte eine densitometrische Auswertung. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden die Zellen mit dem pCAT3-Basic- und mit dem pSV- $\beta$ -Galactosidase-Vektor transfiziert. Die einzelnen CAT-Expressionsstärken der jeweiligen Transfektionsansätze wurden in Bezug auf die Expressionsstärke des ubiquitär-exprimierten humanen Elongationsfaktors (hEF) normalisiert. Es zeigte sich eine hohe Aktivität des humanen TSPY-Promotors in der GC-1spg Zelllinie, jedoch nur eine verminderte Aktivität in der GC-4spc Zelllinie. Dagegen zeigte der humane PGK2-Promotor eine starke Aktivität in der GC-4spc Zelllinie und nur eine geringe Aktivität in der GC-1spg Zelllinie (Abb. 25).





**Abb. 25** Darstellung der Transkriptionsaktivität des humanen TSPY- und des humanen PGK2-Promotors in der GC-1spg- bzw. in der GC-4spc Zelllinie. Die Zellen wurden separat mit einem TSPY-CAT- und mit einem PGK2-CAT Konstrukt transient transfiziert. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurde mit dem pSV-β-Galactosidase (β-Gal)- bzw. mit dem pCAT3-Basic-Konstrukt transfiziert. Die relative Transkriptionsaktivität wurde im Northern Blot mit einer spezifischen CAT cDNA Sonde densitometrisch ausgewertet und im Vergleich zur hEF-Rehybridisierung normalisiert. Es zeigte sich eine hohe Aktivität des humanen TSPY-Promotors in der GC-1spg Zelllinie, jedoch nur eine verminderte Aktivität in der GC-4spc Zelllinie. Dagegen zeigte der humane PGK2-Promotor eine starke Aktivität in der GC-4spc Zelllinie und nur eine geringe Aktivität in der GC-1spg Zelllinie.

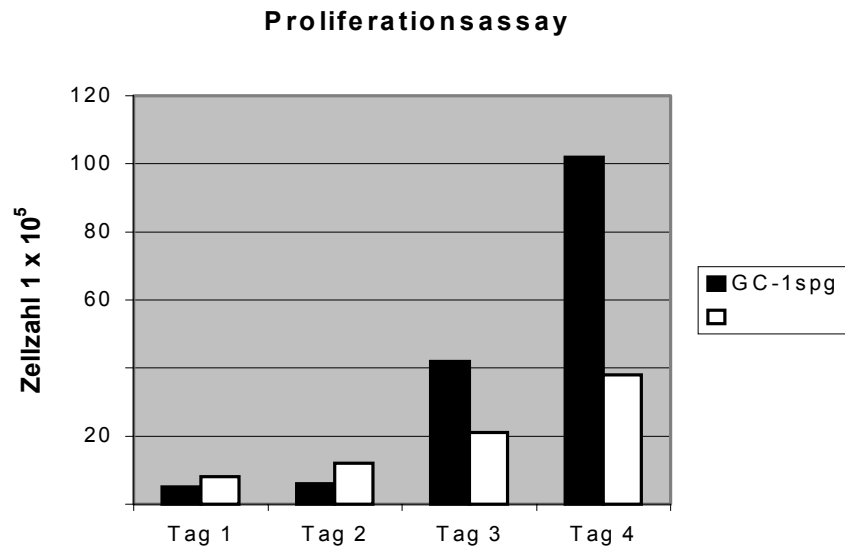
## 5. Vergleich der Spermatogonienzelllinie GC-1spg mit der Spermatozytenzelllinie GC-4spc auf der Ebene des Phänotyps und auf der Ebene der Expression

### 5.1 Phänotypischer Vergleich zwischen GC-1spg und GC-4spc

#### 5.1.1 Proliferationsvergleich

Für den Proliferationsassay wurde eine gleiche Anzahl an GC-1spg und GC-4spc Zellen in Sechschalen-Platten gegeben und für die nächsten vier Tage in einer Neubauer Zählkammer

ausgezählt. Die Zählung erfolgte jeweils in dreifacher Ausführung und immer zur selben Zeit. Bei der GC-1spg Zelllinie konnte ein deutlich stärkerer Anstieg der Proliferation im Vergleich zur GC-4spc Zelllinie beobachtet werden (Abb. 26). Der Proliferationsassay wurde insgesamt in drei unabhängigen Ansätzen vollzogen. Die dargestellten Daten in Abb. 26 entsprechen den Durchschnittswerten sämtlicher durchgeführter Messungen. Eine Zufallswahrscheinlichkeit von  $p < 0.001$  wurde angenommen.

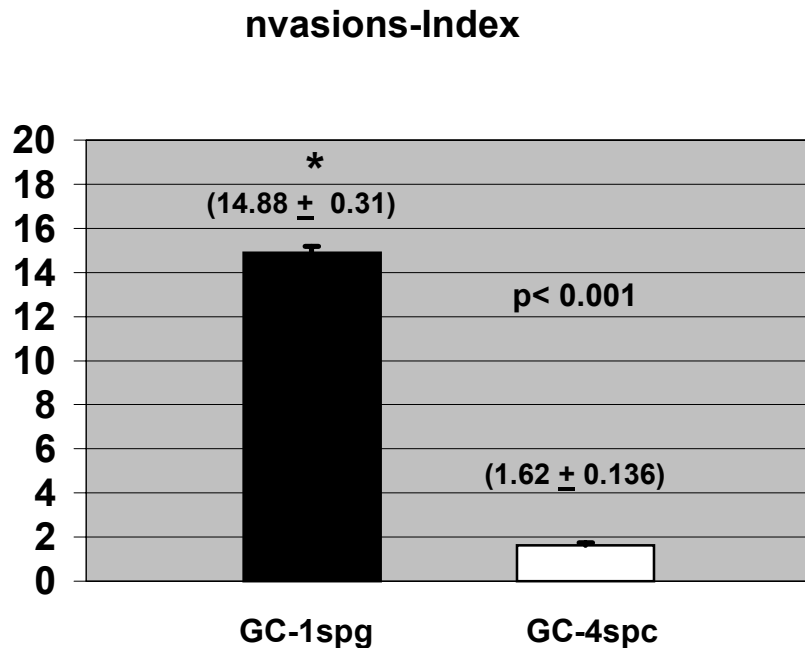


**Abb. 26** Proliferationsassay von GC-1spg Zellen und GC-4spc Zellen. Eine gleiche Anzahl an GC-1spg- und GC-4spc Zellen wurde in sechs-Schalen-Platten gegeben und jede Platte wurde an den darauf folgenden 4 Tagen ausgezählt. Jede Zählung erfolgte in dreifacher Ausführung. Es zeigte sich ein eindeutig stärkeres Wachstum der GC-1spg Zelllinie im Vergleich zur GC-4spc Zelllinie.

#### 5.1.2 Invasivitätsassay

Die Invasivität der GC-1spg- und der GC-4spc Zelllinie wurde über ein Matrigelassay bestimmt. Dabei simuliert die Matrigelmembran die Situation der extrazellulären Matrix *in vitro*. Eine gleiche Anzahl GC-1spg- und GC-4spc Zellen wurde in zwei separaten Ansätzen auf die Matrigelmembran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die durch die Membran invadierten Zellen ausgezählt. Jeder Ansatz wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt und in insgesamt fünf unabhängigen Versuchen wiederholt. Zur Bestimmung des Invasions-Index einer Zellpopulation wurde die Invasion der GC-1spg- und der GC-4spc Zellen

mit der Invasion von Maus NIH3T3-Zellen, die als externe Kontrolle verwendet wurden, ins Verhältnis gesetzt. Es zeigte sich, dass die GC-1spg Zelle ein stark erhöhtes invasives Potential besitzt. Der Invasionsindex der GC-1spg Zelle war im Vergleich zur GC-4spc Zelle um mehr als das 9fache erhöht (Abb. 27).



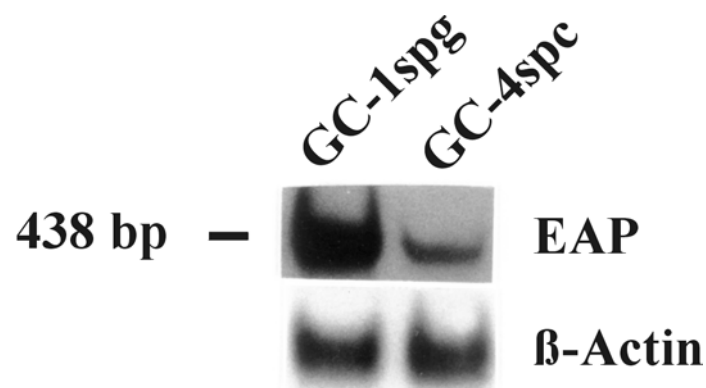
**Abb. 27** Darstellung des Invasions-Index der GC-1spg- und der GC-4spc-Zellen. Der Invasions-Index wird ausgedrückt als das Verhältnis zwischen der Invasion der GC-1spg- bzw. der GC-4spc -Zellen und der Invasion von Maus-NIH3T3 Kontrollzellen. Die dargestellten Daten entsprechen den Durchschnittswerten von fünf unabhängig durchgeführten Messungen. Die GC-1spg Zelle zeigt ein deutlich erhöhtes invasives Potential im Vergleich zur GC-4spc Zelle. Der Stern (\*) markiert einen signifikanten statistischen Unterschied.

## 5.2 Differentielle Genexpression in GC-1spg und GC-4spc

### 5.2.1 Differentielle Expression des onkofetalen Tumormarkers GCAP und des äquivalenten Maus-Isoenzym EAP

Das GCAP („Germ Cell Alkaline Phosphatase“-)Protein wird normalerweise in den primordialen Keimzellen und im Zwei-Zell-Stadium exprimiert. In Seminomen und im *Carcinoma in situ* wird es jedoch überexprimiert (Hofmann et al., 1993). Daher dient das onkofetale Protein

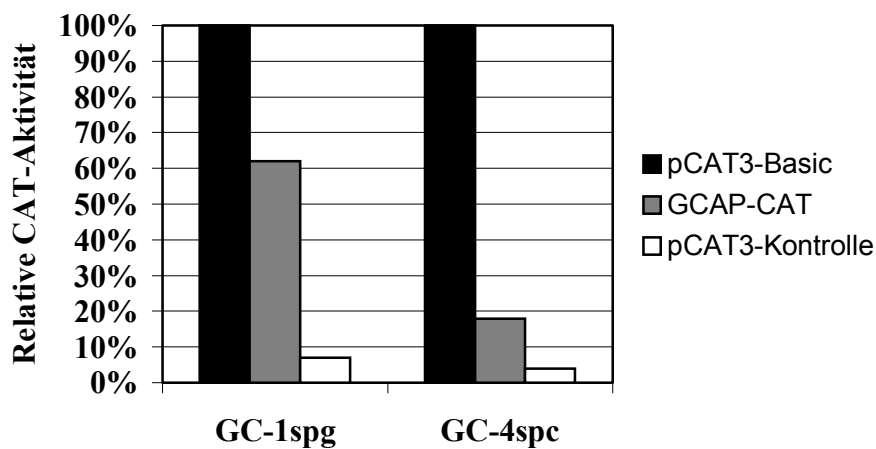
GCAP als Tumormarker. Um das Expressionsmuster von EAP, dem äquivalenten Maus-Isoenzym von GCAP, in GC-1spg- und GC-4spc Zellen zu untersuchen, wurde eine semi-quantitative RT-PCR mit genspezifischen Primern für EAP (EAP-For u. EAP-Rev) durchgeführt. Dabei wurden 2 µg Gesamt-RNA aus GC-1spg- und GC-4spc Zellen jeweils mit einem EAP-Reverse-Primer bzw. als interne Kontrolle mit einem β-Actin-Reverse-Primer in cDNAs umgeschrieben. Um die Anzahl der Zyklen zu bestimmen, in denen es zur exponentiellen Amplifikation des Produktes kommt, wurden in Vorexperimenten mehrere PCR-Reaktionen angesetzt, die sich in der Anzahl der Zyklen (25, 30, 35, 40) unterschieden. Ein 10 µl-Aliquot jedes Reaktionsansatzes wurde auf ein 1.5%iges Agarosegel aufgetragen, und die Intensitätsstärke der amplifizierten Bande wurde beurteilt. Es wurde die Anzahl an Zyklen gewählt, die zum größten exponentiellen Anstieg der Produktmenge führte. Die Evaluierung der Zyklenanzahl wurde jeweils in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die amplifizierten Produkte EAP und β-Actin wurden auf ein 1.5%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Verifikation der amplifizierten Produkte wurden diese im Southern Blot mit einer spezifischen EAP- bzw. β-Actin-cDNA Sonde hybridisiert. Es zeigte sich eine stärkere Expression von EAP in der GC-1spg Zelllinie im Vergleich zur GC-4spc Zelllinie (Abb. 28).



**Abb. 28** Semiquantitative RT-PCR-Analyse unter Verwendung von GC-1spg- bzw. GC-4spc-Gesamt RNA und genspezifischen Primern für EAP. In Vorexperimenten wurde zunächst ein Zyklus innerhalb der exponentiellen Phase bestimmt. Die Amplifikation von Maus-β-Actin wurde als interne Kontrolle verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1.5%iges Agarosegel aufgetragen und im Southern Blot auf eine Membran transferiert. Anschließend wurde mit einer spezifischen Maus-EAP- und β-Actin cDNA-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung zeigte eine deutlich stärkere Expression von EAP in GC-1spg Zellen.

### 5.2.2 Bestimmung der transkriptionellen Aktivität einer 5'-flankierenden Region des humanen GCAP-Gens in GC-1spg und GC-4spc

In einem zweiten Ansatz wurde die transkriptionelle Aktivität einer 1.6 kb großen 5'-flankierenden Region des humanen GCAP-Gens in GC-1spg- und GC-4spc Zellen ausgetestet. Dabei wurde die verwendete Promotorregion an das CAT-Reportergen kloniert und die Zelllinien mit dem GCAP-CAT-Konstrukt transient transfiziert. Anschließend wurde ein CAT-ELISA zur nicht-radioaktiven Bestimmung der CAT-Aktivität durchgeführt. Der pCAT3-Kontrol-Vektor sowie der pCAT3-Basic-Vektor wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle verwendet. Die gemessenen CAT-Aktivitäten wurden in Bezug auf die Aktivität der Positivkontrolle (pCAT3-Kontrolle) sowie in Bezug zur Gesamt-Proteinkonzentration normalisiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der semiquantitativen RT-PCR wurde eine deutlich erhöhte GCAP-Promotoraktivität in den GC-1spg Zellen bestimmt (Abb. 29). Jede Transfektion wurde dabei im Duplikat durchgeführt und mindestens in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt.



**Abb. 29** Bestimmung der transkriptionellen Aktivität einer 1.6 kb großen 5'-flankierenden Region des humanen GCAP-Gens nach transienter Transfektion von GC-1spg- und GC-4spc Zellen mit einem GCAP-CAT-Konstrukt. Die CAT-Aktivität wurde nichtradioaktiv über einen CAT-ELISA bestimmt. pCAT3-Kontrolle bzw. pCAT3-Basic wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle verwendet. Die Werte wurden in Bezug auf die Gesamt-Proteinkonzentration normalisiert. Es manifestierte sich eine deutlich erhöhte Aktivität des humanen GCAP-Promotors in der GC-1spg Zelllinie.

### 5.2.3 Isolierung differentiell exprimierter Gene in GC-1spg über subtraktive Hybridisierung (SH)

Um Gene zu isolieren, die in der GC-1spg Zelllinie überexprimiert sind und damit für den Phänotyp der Zelllinie potentiell verantwortlich sind, wurde die Methode der subtraktiven Hybridisierung (SH) angewandt. Ausgehend von einer synthetisierten GC-1spg cDNA-Bibliothek und einer GC-4spc cDNA-Bibliothek wurden mit der o.g. Methode über 120 cDNA Klone mit einer durchschnittlichen Größe von 600 bp gewonnen. Die cDNA-Fragmente wurden in den pGEM-T-Vektor (Promega, Madison, WI) einkloniert und anschließend sowohl vom 5'-Ende als auch vom 3'-Ende her sequenziert und mit dem BLAST-Programm (Altschul et al., 1990) analysiert. Für die 120 sequenzierten Klone konnten in den öffentlichen Datenbanken (GenBank, EMBL, DDBJ) einerseits bekannte, komplette („full-length“) cDNA-Sequenzen der Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus* oder *Rattus norvegicus* gefunden werden. Andererseits beinhalteten die 120 sequenzierten Klone aber auch unbekannte Sequenzen, die nur als ESTs („expressed sequence tags“) in den öffentlichen Datenbanken registriert sind. Für sämtliche in den Datenbanken „unbekannte cDNA-Sequenzen“ wurden sogenannte Klon-Registriernummern („Accession Numbers“) für die öffentlichen Datenbanken GenBank und EMBL beantragt. Die 16 unbekanntes cDNA-Klone wurden alle im Northern Blot auf eine differentielle Genexpression in GC-1spg Zellen überprüft.

Von den bekannten cDNA-Sequenzen wurden insgesamt 18 Klone im Northern Blot ausgetestet. Unter den im Northern Blot ausgetesteten bekannten Klonen befanden sich 15 als „full-length“ bekannte cDNA-Sequenzen der Spezies *Mus musculus*, eine als „full-length“ bekannte cDNA-Sequenz der Spezies *Rattus norvegicus* und zwei als „full-length“ bekannte cDNA-Sequenzen der Spezies *Homo sapiens*. Die Northern Blots wurden jeweils mit 20 µg isolierter Gesamt-RNA aus GC-1spg, GC-4spc, Testis und Leber durchgeführt. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurden die Northern Blots mit einer hEF cDNA-Sonde rehybridisiert. Anschließend wurden die Bandenstärken visuell ausgewertet und auf eine differentielle Genexpression in GC-1spg überprüft.

Insgesamt konnten 8 bekannte cDNA-Klone identifiziert werden, die in der GC-1spg Zelllinie überexprimiert werden (Abb. 30; Tab. 4A). Namentlich waren dies: L6 Antigen (Accession Nr. L15429), Annexin VIII (Accession Nr. NM013473), Integrin alpha 6 (Accession Nr.

NM008397), Retrotransposon BVL-1 (Accession Nr. X17124), LPS-Bindungsprotein (Accession Nr. X99347), „Protective“-Protein (Accession Nr. J05261), „replacement variant histone 3.3“ (Accession Nr. X13605) und Cadherin-assoziiertes-Protein alpha-Catenin (Accession Nr. D90362). Von den 16 unbekanntenen cDNA-Klonen konnte eine Überexpression der Klone 26, 45, 84 und 87 in der GC-1spg Zelllinie gezeigt werden (Abb. 31; Tab. 4B).

**A**

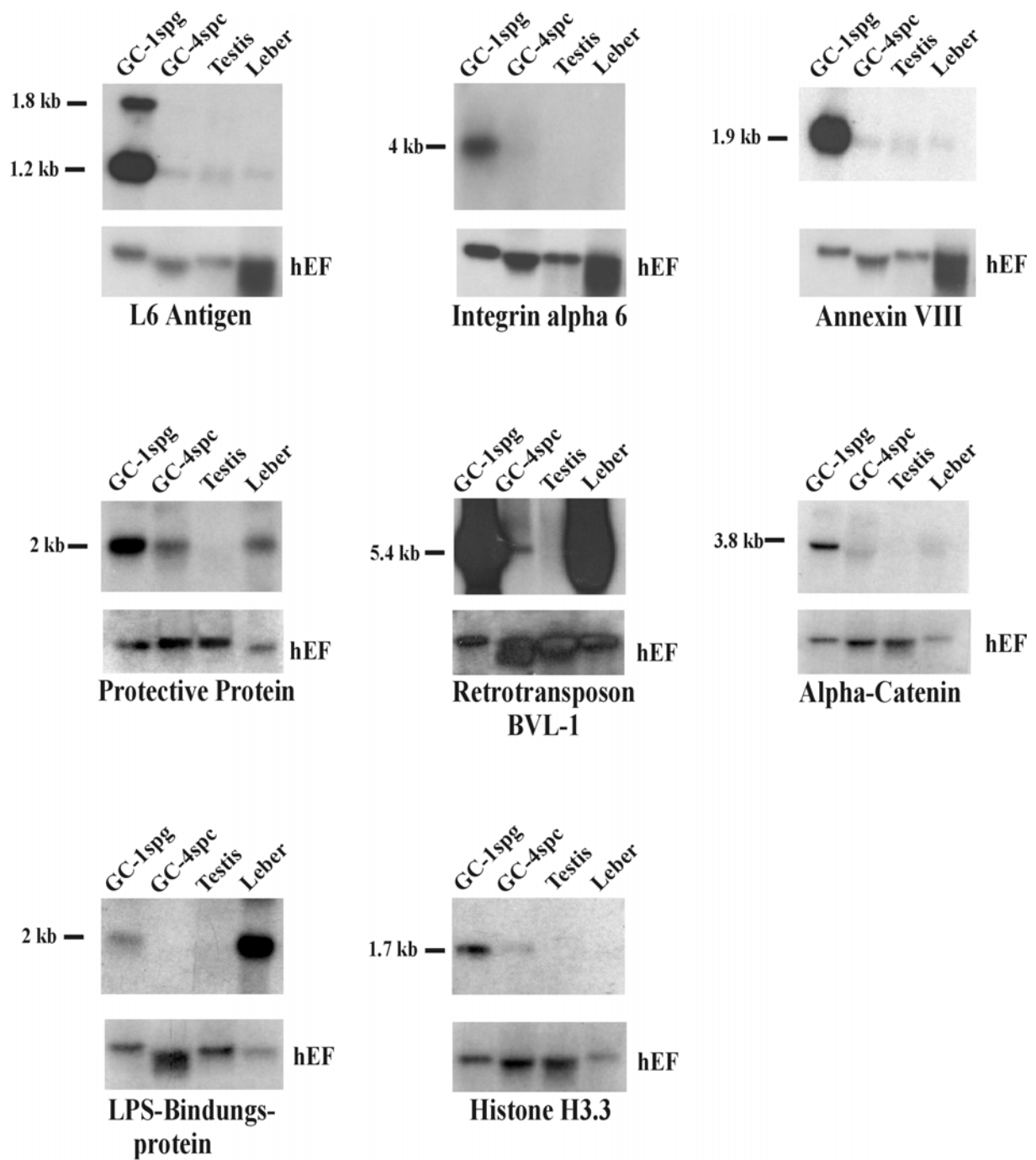
Klon Nr.	Name/Accession Nr.	GC-1	GC-4	Testis	Leber
4	Annexin VIII (NM_013473)	+++	-	-	-
22	Glutamin synthetase (NM_008131)	+	+	-	+
24	Integrin $\alpha$ -6 Untereinheit (NM008397)	++	s	-	-
30	LPS-Bindungsprotein (X99347)	+	-	-	+++
31	Protectives Protein (Mo54) (J05261)	+++	+	-	++
39	Beta2-Microglobulin (X01838)	++	+++	+	++++
40	“Replacement variant histone H3.3” (X13605)	++++	++	s	s
41	Minopontin (X13986)	+	++	-	s
48	“Virus (VL30) like retrotransposon BVL-1” (X17124)	++++	+	-	+++
64	Sterol C5-Desaturase (AB016248)	+	+	-	+
68	HSPC227 Protein ( <i>Homo sapiens</i> ) (AF151061)	+	+	-	s
70	“HMG-box containing protein1” ( <i>Rattus norvegicus</i> ) (U09551)	+	+	s	+
73	Sid 3177(AB024935)	++	++	s	s
74	CGI-62 Protein ( <i>Homo sapiens</i> ) (AF151820)	s	s	-	-
77	Cadherin-assoziiertes Protein(CAP102/alpha catenin) (D90362)	++++	+	s	+
85	„Tissue plasminogen activator“ (J03520)	s	s	-	-
96	L6 Antigen (L15429)	+++	s	s	s
115	p8 (AF131196)	++	++	-	-

**B**

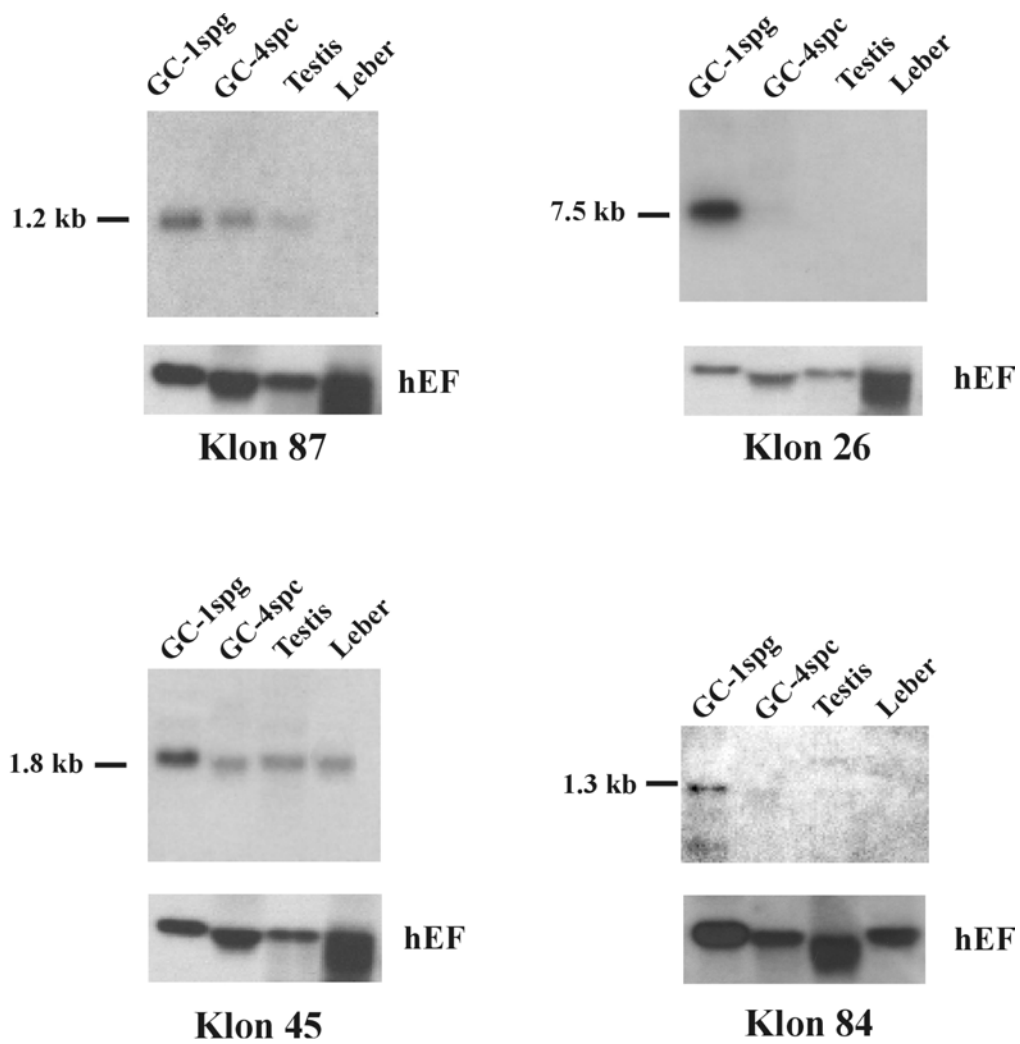
Klon Nr.	Accession Nr.	GC-1	GC-4	Testis	Leber
10	BE352841	++	++	s	s
26	BE352838	++	-	-	-
45	AF284439	+++	+	+	+
49	BE352837	++	++	s	+
54	BE352836	+++	+++	+++	+++
55-4	BE352835	++	++	++	++
66	BE352834	-	-	-	-
69	BE352832	+	+	-	-
84	-	+	-	-	-
86	BE352830	++	+++	-	+
87	-	++	+	+	+
88	BE352829	s	s	s	s
91	BE352828	-	-	-	-
108	BE352840	+	+	s	s
109	BE456150	+	+	s	+
119	BE352839	+	+	s	+

**Tab. 4** Mit Hilfe der subtraktiven Hybridisierung (SH) erfolgte die Isolierung von insgesamt 120 cDNA-Klonen, die potentiell in der GC-1spg Zelllinie differentiell exprimiert werden. Insgesamt wurden 34 cDNA-Klone im Northern Blot auf eine differentielle Expression in GC-1spg Zellen überprüft. Für die Northern Blots wurden 20 µg isolierte Gesamt-RNA aus GC-1spg, GC-4spc, Testis und Leber verwendet. **(A)** Darstellung der Expressionsstärke der bekannten cDNA-Sequenzen. **(B)** Darstellung der Expressionsstärken der 16 unbekannt cDNA-Sequenzen. Für die unbekannt cDNA-Sequenzen wurden bis auf den Klon 84 und 87 sogenannte Klon-Registriernummern (Accession Nummern) beantragt. Die Expressionsstärke wurde ins Verhältnis zur hEF-Rehybridisierung gesetzt. Die Expressionstärke korreliert mit der Anzahl an + Zeichen, S=schwache Expressionsstärke und - bedeutet keine detektierte Hybridisierung im Northern Blot.





**Abb. 30** Northern Blot-Analyse der 8 bekannten und in GC-1spg Zellen überexprimierten cDNA-Klone. Insgesamt wurden 18 bekannte cDNA-Klone im Northern Blot auf eine differentielle Expression in GC-1spg Zellen überprüft. Die Northern Blots wurden jeweils mit 20 µg isolierter Gesamt-RNA aus GC-1spg, GC-4spc, Testis und Leber durchgeführt. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurden die Northern Blots mit einer spezifischen hEF cDNA-Sonde rehybridisiert.



**Abb. 31** Northern Blot-Analyse für 4 unbekannte und in GC-1spg Zellen überexprimierte cDNA-Klone. Insgesamt wurden 16 unbekannte cDNA-Klone im Northern Blot auf eine differentielle Expression in GC-1spg Zellen überprüft. Die Northern Blots wurden jeweils mit 20 µg isolierter Gesamt-RNA aus GC-1spg, GC-4spc, Testis und Leber durchgeführt. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurden die Northern Blots mit einer spezifischen hEF cDNA-Sonde rehybridisiert

## **6. Isolierung, Charakterisierung und funktionelle Untersuchungen zu NIF3L1 und seines Maus-homologen Nif311**

### **6.1 Isolierung der „full-length“ cDNA für das Maus-Nif311 und für das humane NIF3L1**

Bei der Isolierung differentiell exprimierter Gene in der GC-1spg Zelllinie über SH wurden insgesamt 8 bekannte und 4 unbekannte cDNA-Klone identifiziert, die in der GC-1spg Zelllinie überexprimiert werden (III. 5.2.3). Von den unbekanntem und in der GC-1spg-Zelllinie überexprimierten cDNA-Klonen wurde Klon 45 für weiterführende Experimente ausgewählt. Im Northern Blot zeigte der Klon eine ungefähre Transkriptgröße von 1.85 kb, zusätzlich konnten noch zwei weitere Transkripte bei ca. 3.4 kb und 2.4 kb detektiert werden. Über SH wurde eine cDNA von 690 bp der 3'-UTR amplifiziert.

Die in späteren Experimenten vervollständigte cDNA-Sequenz des Klons 45 zeigte auf Aminosäureebene starke Homologien zum Hefe Protein „Ngg1-interacting factor3 (NIF3)“ (Accession Nr. P53081). Aus diesem Grund wurde das Maus-homologe Protein Nif311 („Ngg1 interacting factor3 like-1“) genannt. Das entsprechende menschliche homologe Protein wurde mit NIF3L1 bezeichnet. Die Symbol- und Namensgebung entspricht der „International System for Gene Nomenclature (ISGN)“ und wurde von dieser Institution akzeptiert. In der öffentlichen Datenbank GenBank wurde die humane NIF3L1 cDNA Sequenz unter der Accession Nummer AF283538 registriert, und die Nif311 cDNA Sequenz der Maus wurde unter der Accession Nummer AF284439 registriert.

Die vollständige cDNA von Nif311 wurde durch ein PCR-„screening“ einer adulten Maus-Testis MATCHMAKER cDNA-Bibliothek isoliert. Dabei wurden 2 µg cDNA, ein vektorspezifischer Primer (5'-GAL Ac) sowie ein genspezifischer Primer (45-Rev), der am 3'-Ende der Nif311-Sequenz bindet, in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Anschließend wurde ein 1µl-Aliquot in eine zweite („nested“)-PCR eingesetzt. Um die Produktspezifität zu erhöhen, wurden zwei sogenannte „nested“-Primer verwendet, die sich ca. 20 bp näher zum jeweiligen 3'-Ende befinden (5'-Match; 45-Rev1). Das amplifizierte Produkt wurde in den pGEM-T-Vektor (Promega, Madison, WI) subkloniert und von beiden Enden sequenziert. Die erhaltene Se-

quenz wurde mit dem BLAST-Programm analysiert (Altschul et al., 1990). Die Nif311 cDNA der Maus umfasst eine 5'-UTR von 528 bp, einen offenen Leserahmen von 1128 bp und eine 3'-UTR von 195 bp (Abb. 32 A, B). Die 3'-UTR ist durch ein modifiziertes Polyadenylierungssignal (AUUAAA) an der Nukleotidposition 1841-1845 charakterisiert. Datenbankrecherchen bestätigten die Existenz von mehr als 15 weiteren ESTs („expressed sequence tags“), die ebenfalls dieses putativ modifizierte Polyadenylierungssignal aufweisen. Darüber hinaus zeigten Sequenzanalysen des isolierten Maus-genomischen Cosmid-Klons von Nif311 (Klon- Nr. MPMGc121L02270Q2) in 3'-Richtung des Gens ebenfalls das modifizierte Polyadenylierungssignal. Der offene Leserahmen kodiert für ein 376 Aminosäuren großes Protein mit einer molekularen Masse von 41.7 kDa. Der theoretische *pI* liegt bei 6.27.

Die humane NIF3L1 cDNA wurde über Datenbankrecherchen identifiziert. Dabei zeigte ein humaner EST-Klon (Accession Nr. AA205969), der von einer humanen Neuroepithel-cDNA-Bibliothek isoliert wurde, eine 83%ige Homologie auf Nukleotidebene zu dem 690 bp großen cDNA-Klon der Maus vom 3'-Ende, der durch SH isoliert wurde. Der humane cDNA-Klon wurde von der RZPD (Ressourcen Zentrum/Primär-Datenbank im Deutschen Humangenomprojekt) bestellt und von beiden Enden sequenziert. Der cDNA-Klon umfasst eine Gesamtsequenz von 1405 bp einschließlich eines Poly A-Schwanzes und eines Polyadenylierungssignals (AAUAAA). Ein weiterer EST-Klon (Accession Nr. R15221), der aus einer humanen Gehirn cDNA-Bibliothek isoliert wurde, zeigte weitere 20 bp Sequenzinformation in der 5'-UTR. Die humane NIF3L1 cDNA-Sequenz umfasst einen offenen Leserahmen von 1131 bp sowie eine 3'-UTR von 248 bp (Abb. 33). Der offene Leserahmen kodiert für ein putatives Protein von 377 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 41.968 kDa. Der theoretische *pI* von NIF3L1 liegt bei 6.19. Die Nif311 cDNA der Maus zeigt auf Nukleinsäureebene und Aminosäureebene eine 86%ige Homologie zur humanen NIF3L1 cDNA.

## A

```
1          gcgctcagcaccactgctgcggaacgaaaag
34 cctcaactacaagggccggcatgcctgcgggttccaaaggcgtgt
79 ctgtgcgccacagaagtgaagcccggagccctccgcagggagccc
124 ggagccctccgcaggggacgcctactctcccgtcagtctctcct
169 catcacaccgactaggactcggaggaccacgcacctaccctcgcg
214 gccctgagagctctaccacaaacctcactaagaagcagaaccgcg
```

### III. Ergebnisse

---

259 ctgtcgcgccagcaacttcatacagcggcctggagtgggaagcaga  
304 acgcacaggaccaattccgccaacttcacacagcggcctggagt  
349 cggaagcagaacgcacaggacaacttccgccaacttcacacagc  
394 ggcttggagtgcgaagcagaacgcacaggaccacttctgccaac  
439 tctttccacaaagccaggagcttcagagcagagcggaagtgatac  
484 actgaaagagcttctgcgactggcacccttctccctggtttccgt  
529 **ATG**CTGTCATCGGCACACATAGTCCCTACAAGTGTGCAACGTGCC  
**M** L S S A H I V P T S V Q R A 15  
574 CAGTCGTGGATCTGCAGGTCTTCCCGTTCCCTTCATGGATCTGAAG  
Q S W I C R S S R S F M D L K 30  
619 GCTCTTCTCTCGTCTTGAATGACTTTGCATCCCTCTCATTTGCT  
A L L S S L N D F A S L S F A 45  
664 GAGAGCTGGGACAATGTGGGATTACTGGTGGAGCCAAGCCCACCC  
E S W D N V G L L V E P S P P 60  
709 CATACTGTAAATACACTCTTCCCTGACCAATGACCTGACGGAGGAG  
H T V N T L F L T N D L T E E 75  
754 GTCATGGACGAGGCTCTGCAAAAAGAAGGCAGACTTCATTCTCTCC  
V M D E A L Q K K A D F I L S 90  
799 TACCATCCACCTATTTTCCGGCCCATGAAGCACATAACTTGAAA  
Y H P P I F R P M K H I T W K 105  
844 ACCTGGAAGGAGTGTCTCGTGATCCGGGCTCTGGAGAACAGAGTC  
T W K E C L V I R A L E N R V 120  
889 GCTGTCTACTCTCCCCACACAGCCTATGATGCGGCACCCAGGGA  
A V Y S P H T A Y D A A P Q G 135  
934 GTCAACAGCTGGTTGGCCAAAGGGCTTGGAACTTGCACTACCAGG  
V N S W L A K G L G T C T T R 150  
979 CCCATCCACCCTTCCAGAGCTCCAGACTACCCACAGAGGGAGCT  
P I H P S R A P D Y P T E G A 165  
1024 CACCGACTAGAATTCAGTGTGAACCGCAGCCAAGACCTGGACAAA  
H R L E F S V N R S Q D L D K 180  
1069 GTCATGTCTACACTGAGAGGGGTTGGAGGTGTCTCTGTCACTTCT  
V M S T L R G V G G V S V T S 195  
1114 TTTCCCTGCCAGGTGTGATGGTGAAGAGCAAACCCGGATCAGCCTG  
F P A R C D G E E Q T R I S L 210  
1159 AATTGTACTCAGAAGACTTTGATGCAGGTGCTAGCCTTTCTTTCC  
N C T Q K T L M Q V L A F L S 225  
1204 CAGGACAGACAACTTTATCAGAAAAGTGAATTTCTTTTCACTGGAG  
Q D R Q L Y Q K T E I L S L E 240  
1249 AAGCCTTTGCTTCTGCATACTGGAATGGGACGGTGTGCACACTG  
K P L L L H T G M G R L C T L 255  
1294 GATGAATCTGTCTCCCTGGCAATAATGATAGAGCGAATCAAAACA  
D E S V S L A I M I E R I K T 270  
1339 CACCTAAAGCTGTGCGCATCTTCGCTTAGCTCTTGGAGTGGGGAGA  
H L K L S H L R L A L G V G R 285  
1384 ACATTAGAGTCCCAAGTCAAAGTTGTGGCCCTGTGTGCTGGTTCT  
T L E S Q V K V V A L C A G S 300  
1429 GGGGGCAGTGTCTACAAGGAGTGGAGGCCGACCTTTACCTCACA  
G G S V L Q G V E A D L Y L T 315  
1474 GGTGAAATGTCCCACCATGATGTTCTGGATGCTGCTTCCAAAGGG  
G E M S H H D V L D A A S K G 330  
1519 ATCAATGTCATCCTTTGTGAACACAGCAACACTGAAAGAGGCTTC  
I N V I L C E H S N T E R G F 345  
1564 CTTTCTGAGCTTCAAGAAATGCTGGGTGTTCACTTTGAGAATAAG  
L S E L Q E M L G V H F E N K 360  
1609 ATTAACATTATCCTGTCTGAGACAGACAGGGACCCTCTCCGTGTG  
I N I I L S E T D R D P L R V 375  
1654 GTT**TAA**atgcaaggacgtcaaggacaccatgatgacagaagccac

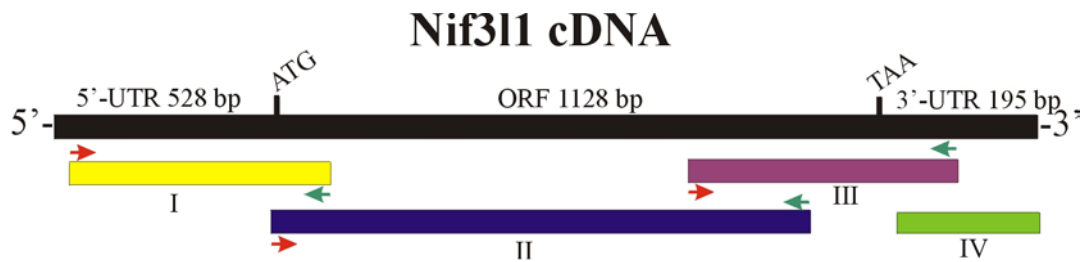
376

V \*

```

1699 agatcacctggattgaaacggctgtgcaggagttggtggtccacc
1744 ctgcagagctgtattggacttctcatttcagttcacgactctg
1789 tcaacaaaagccatagctcattcggtaaaaactgtctgtaaaga
1837 gtacattaaaggcaaaccttctct
    
```

## B



**Abb. 32** (A) Darstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Maus-Nif311. Das putative, modifizierte Polyadenylierungssignal (ATTAAAA) ist unterstrichen dargestellt. Das Translations-Startkodon ATG sowie das Translations-Stopkodon TAA sind fett markiert. Die Nukleotidsequenz wurde in der öffentlichen Datenbank Genbank unter der Accession Nr. AF284439 registriert. (B) Schematische Darstellung der Nif311 cDNA-Sequenz der Maus. Die farbigen Balken zeigen die vier vorhandenen partiellen cDNA-Klone (I-IV). Die eingezeichneten Pfeile symbolisieren die vorhandenen genspezifischen Primer (grün = Forward-Primer, rot = Reverse-Primer).

```

1                               cagagaagtttccgggact
20  gaaacttgaactttacctgatttctgtATGTTGTCATCTTGC GTA      6
                                     M L S S C V
66  CGCCCAGTCCCCACGACAGTCCGGTTTGTAGATTCCTGATCTGC      21
    R P V P T T V R F V D S L I C
111 AATTCTTCCCGTTCCTTCATGGATTTGAAGGCTCTCCTTTCTTCC      36
    N S S R S F M D L K A L L S S
156 TTGAATGACTTTGCATCCCTCTCGTTTGCTGAGAGTTGGGACAAT      51
    L N D F A S L S F A E S W D N
201 GTTGGATTACTGGTGGAACCAAGCCCACCACATACTGTAAATACA      66
    V G L L V E P S P P H T V N T
246 CTCTTCCTGACCAATGACCTGACTGAGGAAGTGATGGAGGAGGTG      81
    L F L T N D L T E E V M E E V
291 CTGCAAAAGAAGGCAGACCTCATTCTCTCCTACCATCCGCCATATC      96
    L Q K K A D L I L S Y H P P I
336 TTCCGACCCATGAAGCGCATAACCTGGAACACATGGAAGGAGCGC      111
    F R P M K R I T W N T W K E R
381 CTGGTGATCCGGGCTCTGGAGAACAGAGTCGGTATCTACTCTCCT      126
    L V I R A L E N R V G I Y S P
    
```

### III. Ergebnisse

```
426 CATAACAGCCTATGATGCTGCGCCCCAGGGCGTCAACAACCTGGTTG
    H T A Y D A A P Q G V N N W L 141
471 GCTAAAGGGCTTGGAGCTTGTACCTCCAGGCCCATACATCCTTCC
    A K G L G A C T S R P I H P S 156
516 AAAGCTCCCAACTACCCTACAGAGGGAAACCACCGAGTAGCAATTC
    K A P N Y P T E G N H R V E F 171
561 AACGTAACTACACCCAAGACCTGGACAAAAGTCATGTCTGCAGTG
    N V N Y T Q D L D K V M S A V 186
606 AAAGGAATTGACGGTGTCTTCTGTCACTTCTTTTCTGCTAGGACT
    K G I D G V S V T S F S A R T 201
651 GGTAATGAGGAACAAACACGGATTAATCTGAATTGTACTCAGAAG
    G N E E Q T R I N L N C T Q K 216
696 GCTTTGATGCAGGTGGTAGATTTTCTTTCCCGGAACAAAACAACCT
    A L M Q V V D F L S R N K Q L 231
741 TATCAGAAGACGGAAATTCTGTCACTGGAGAAGCCTTTGCTTCTA
    Y Q K T E I L S L E K P L L L 246
786 CATACTGGAATGGGACGGTTATGCACACTGGATGAATCTGTCTCC
    H T G M G R L C T L D E S V S 261
831 CTGGCAACCATGATTGATCGAATAAAAAGACACCTAAAACCTATCT
    L A T M I D R I K R H L K L S 276
876 CATATTCGCTTAGCCCTTGGGGTGGGGAGAACCTTAGAGTCTCAA
    H I R L A L G V G R T L E S Q 291
921 GTCAAAGTCGTGGCCCTGTGTGCTGGTTCTGGGAGCAGCGTTCTG
    V K V V A L C A G S G S S V L 306
966 CAGGGTGTGAGGCTGACCTTTACCTCACAGGTGAGATGTCCCAT
    E A Q G V D L Y L T G E M S H 321
1011 CATGATACTTTGGATGCTGCTTCCCAAGGAATAAATGTCATCCTC
    H D T L D A A S Q G I N V I L 336
1056 TGTGAACACAGCAACACTGAACGAGGCTTTCTTTCTGACCTTCGA
    C E H S N T E R G F L S D L R 351
1111 GATATGCTGGATTCTCACTTGGAGAATAAGATAAATATTATCCTA
    D M L D S H L E N K I N I I L 366
1146 TCAGAGACTGACAGGGACCCTCTTCAGGTGGTATAAAttgcagaaa
    S E T D R D P L Q V V * 377
1191 catcaggataaacacattctacaaatcagctggatgccaaacttaa
1236 tttgtaacatgagtcagtgaggactggtgtgcttccagagagtgtc
1281 ttcgagggtatcatcatttccggtttgtaaatcttattcaccaaa
1326 tgttctatcgctcgtgaaggtaaaactgtaataataactaccatatt
1371 aaataacaaatgttcattataaactctaggaaagattgaaataaaa
1416 tctgtttactt
```

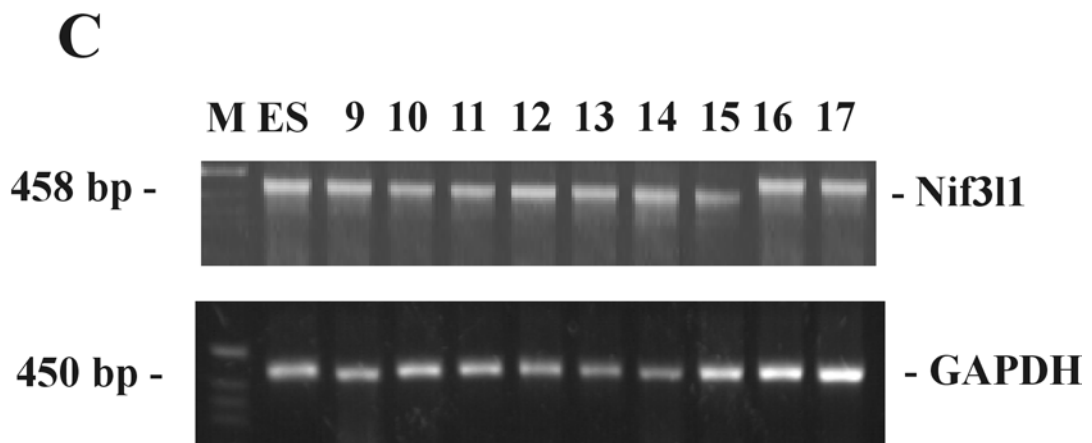
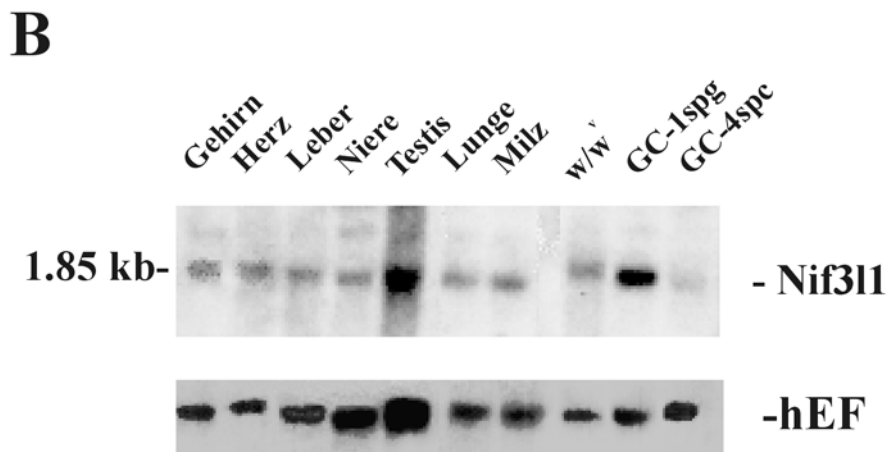
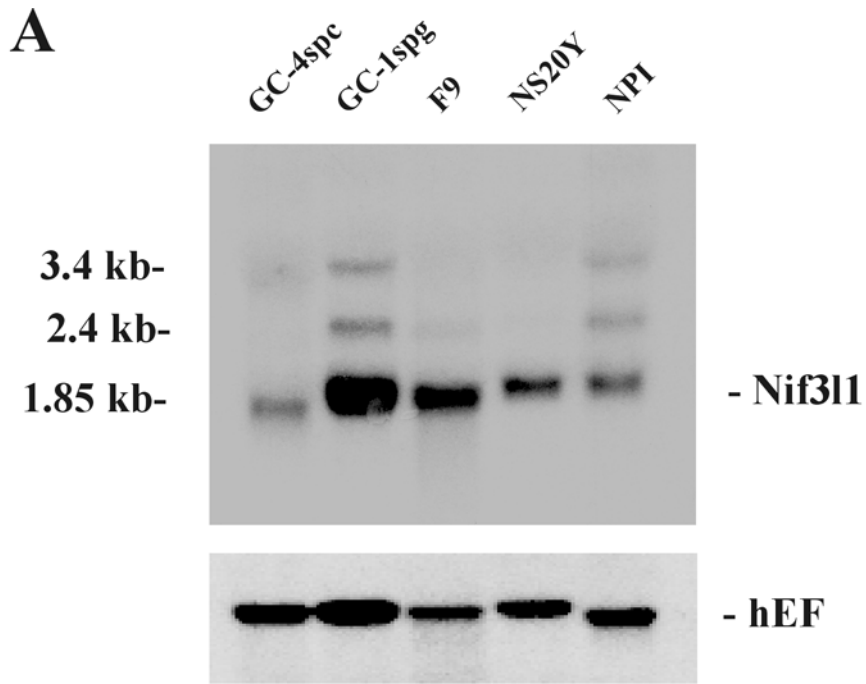
**Abb. 33** Darstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des humanen NIF3L1. Das putative Polyadenylierungssignal (AATAAA) ist unterstrichen dargestellt. Das Translations- Startkodon und –Stopkodon sind hervorgehoben dargestellt. Die von dem humanen genomischen Klon NH0469M07 abgeleitete Exon-Intron Übergänge sind schattiert dargestellt.

## 6.2 Expressionsanalysen von Maus-Nif311

Northern Blot-Analysen mit jeweils 20 µg isolierter Gesamt-RNA aus GC-1spg, GC-4spc, F9 (Maus-Teratokarzinomzelllinie), NS20Y (Maus-Neuroblastomzelllinie) und NPI (Maus-Nierenzelllinie) zeigten eine starke Überexpression des ca. 1.85 kb großen Nif311-Transkripts in der GC-1spg- und in der F9 Zelllinie. Im Gegensatz dazu fand sich eine geringere Expression in der GC-4spc-, in der NS20Y- und in der NPI-Zelllinie. Eine Überexposition zeigte zwei weitere Transkripte bei ca. 3.4 kb und 2.4 kb (Abb. 34A).

Darüber hinaus ergaben Northern Blot-Analysen mit RNAs aus verschiedenen postnatalen Geweben der Maus eine ubiquitäre Expression von Nif311 (Abb. 34B). Eingesetzt wurden jeweils 20 µg isolierte Gesamt-RNA aus Gehirn, Herz, Leber, Niere, Testis, Lunge, Milz, Testis von W/W<sup>v</sup>, GC-1spg- und GC-4spc-Zellen. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurden die Northern Blots mit einer spezifischen hEF cDNA-Sonde rehybridisiert. RT-PCR-Analysen an isolierter Gesamt-RNA aus embryonalen Stammzellen sowie an isolierter Gesamt-RNA pränatalen Stadien von 9.5 d.p.c.- 17.5 d.p.c. zeigten ebenfalls eine ubiquitäre Expression von Nif311 in allen Entwicklungsstadien (Abb. 34C). Für die RT-PCR wurden die genspezifischen Primer 45-F und 45-R verwendet, die beide in verschiedenen Exons lokalisiert sind, unter Verwendung der genomischen Struktur des Menschen als Referenz. Außerdem zeigten Datenbankrecherchen die Existenz von EST-Klonen (Accession Nr. AA561093, AI606390, AI504836), die aus einer Maus-Blastozysten cDNA-Bibliothek isoliert wurden und die eine 100%ige Homologie zu Nif311 in der 3'-UTR und in der translatierten Region aufweisen.

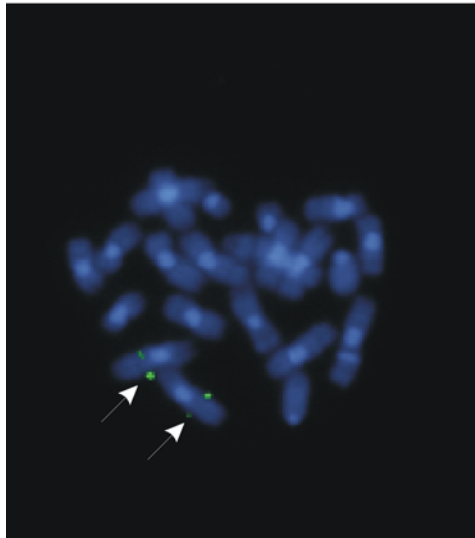




**Abb. 34** Darstellung der Expressionsanalysen von Maus-Nif311 unter Verwendung von Maus-Zelllinien und postnataler- bzw. pränataler Gewebe. **(A)** Northern Blot-Analyse mit 20 µg isolierter Gesamt-RNA aus den Zelllinien GC-1spg (Spermatogonien-Zelllinie), GC-4spc (Spermatozyten-Zelllinie), F9 (Teratokarzinom-Zelllinie), NS20Y (Neuroblastom-Zelllinie) und NPI (Nieren-Zelllinie). Die Northern Blots wurden mit einer Maus-Nif311 spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Transkripte von ungefähr 1.85 kb konnten ubiquitär detektiert werden. Eine Überexposition zeigte zwei weitere Transkripte bei ca. 3.4 kb und 2.4 kb. Eine starke Überexpression konnte in der Spermatogonien-Zelllinie GC-1spg sowie in der Maus-Teratokarzinom-Zelllinie F9 beobachtet werden. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurden die Northern Blots mit einer spezifischen hEF cDNA –Sonde rehybridisiert. **(B)** Northern Blot-Analyse mit 20 µg isolierter Gesamt-RNA aus verschiedenen Maus-Geweben und aus Testes der W/W<sup>v</sup>-Mutante. Die Northern Blots wurden mit einer spezifischen Maus-Nif311 cDNA-Sonde hybridisiert. Transkripte von ungefähr 1.85 kb konnten ubiquitär detektiert werden. Eine Überexposition zeigte zwei weitere Transkripte von ca. 3.4 kb und 2.4 kb. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurden die Northern Blots mit einer spezifischen hEF cDNA-Sonde rehybridisiert. **(C)** RT-PCR-Analysen unter Verwendung von Gesamt-RNA embryonaler Stadien von 9.5 d.p.c.-17.5 d.p.c. sowie isolierter RNA aus ES-Zellen. Für die RT-PCR wurden die genspezifischen Primer 45-F und 45-R verwendet, die beide in verschiedenen Exons lokalisiert sind, unter Verwendung der genomischen Struktur des Menschen als Referenz. Ein PCR-Produkt von 458 bp konnte in jedem Gewebe analysiert werden. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurde eine RT-PCR mit genspezifischen Primern für β-Actin durchgeführt. (ES = isolierte RNA aus embryonalen Stammzellen)

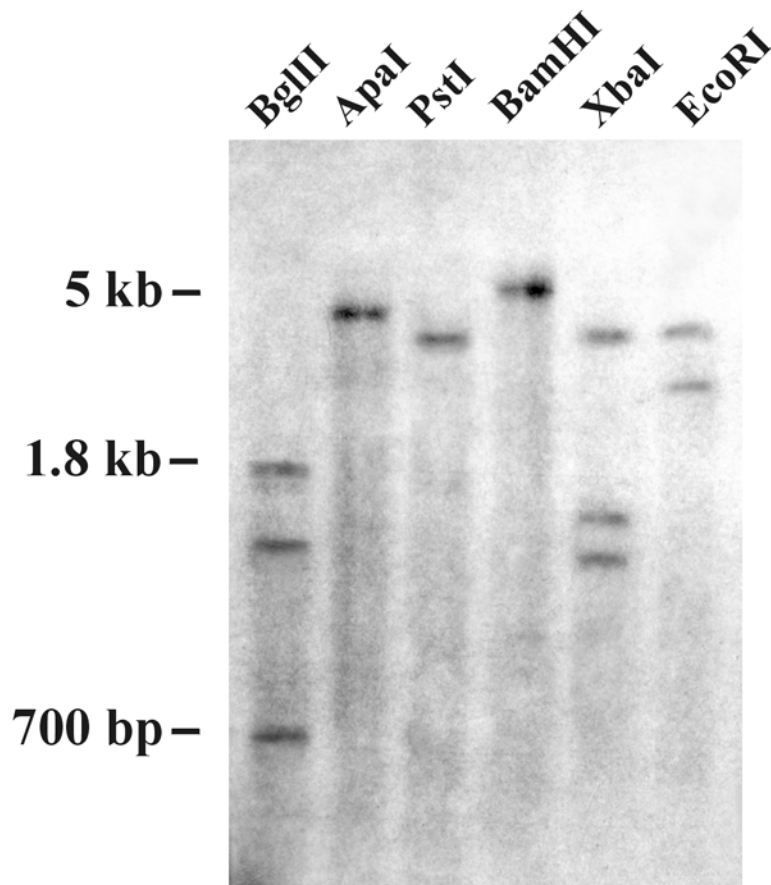
### 6.3 Genomische Struktur und chromosomale Lokalisation von NIF3L1 und seines Maus-homologen Nif311

Eine Maus-Cosmid-Bibliothek (129/ola) der RZPD wurde mit einer radioaktiv markierten 690 bp großen 3'-Sonde von Nif311 „gescreent“. Dadurch konnte ein positiver Cosmid-Klon identifiziert werden. Zur Verifikation der Spezifität des Cosmid-Klons für Nif311 wurde dieser partiell sequenziert und darüber hinaus mit einer Nif311-spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Die Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) des isolierten Cosmid-Klons für Nif311 an Metaphasechromosomen der Zelllinie WMP-1 (Zörnig et al., 1995) ergab eine chromosomale Zuordnung auf Chromosom 1, Region C (Abb. 35).



**Abb. 35** Chromosomale Lokalisation des Nif311-Gens der Maus durch Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) an Metaphasechromosomen der WMP-1-Zelllinie der Maus unter Verwendung des Maus-Nif311- genomischen Cosmid-Klons als Sonde. Die dargestellten Pfeile zeigen die spezifischen Signale des Nif311-Gens der Maus auf Chromosom 1, Region C.

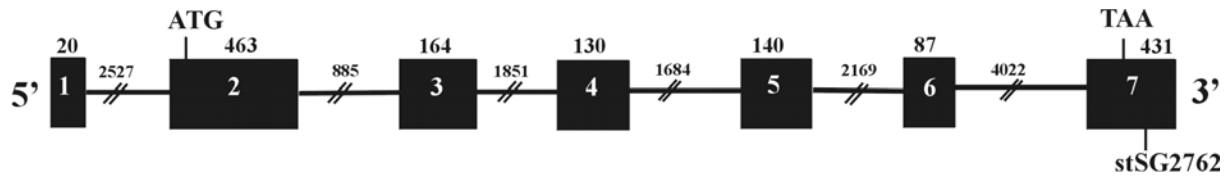
Im Southern Blot unter Verwendung von 20 µg genomischer DNA, die vorher mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt wurde, konnte nach einer Hybridisierung mit der verwendeten 690 bp großen 3'-Sonde von Nif311 das typische Bandenmuster eines „Single Copy“- Gens beobachtet werden (Abb. 36). Unterstützt wird diese Aussage dadurch, dass bei dem „screening“ der genomischen Maus-Cosmid Bibliothek mit einer spezifischen Nif311-cDNA-Sonde, nur ein einziger Cosmid-Klon hybridisierte.



**Abb. 36** Southern Blot mit jeweils 20 µg genomischer DNA der Maus. Hybridisiert wurde mit einer 690 bp großen 3'-Sonde von Nif311. Das erhaltene Bandenmuster ist charakteristisch für ein „Single-Copy“-Gen.

Datenbankrecherchen zeigten die Existenz eines humanen genomischen Klon (Klon NH0469M07, Accession Nr. AC005037), der die gesamte genomische Sequenz des humanen NIF3L1-Gens umfasst. Durch einen Vergleich der cDNA-Sequenz von NIF3L1 mit der Sequenz des genomischen humanen Klons, ließ sich die Organisation des NIF3L1-Gens aufklären. Das NIF3L1-Gen besteht aus insgesamt sieben Exons und sechs Introns. Das vollständige humane NIF3L1-Gen umspannt eine genomische Sequenz von 14.5 kb (Abb.37). Unter Verwendung von elektronischer PCR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/epcr.cgi>)(II.6.7), einem Datenbankprogramm, das die jeweilige Sequenz mit bekannten STS („sequence tagged site“)-Markern vergleicht (Schuler et al., 1998), konnte sowohl in dem humanen genomischen Klon (Klon NH0469M07, Accession Nr. AC005037) als auch in der NIF3L1 cDNA-Sequenz der stSG2726- Marker gefunden werden. Dieser Marker ist chromosomal lokalisiert auf Chromosom 2q33, im Interval D2S115-D2S307 (201.7 cM-205.4 cM). Diese Region ist ho-

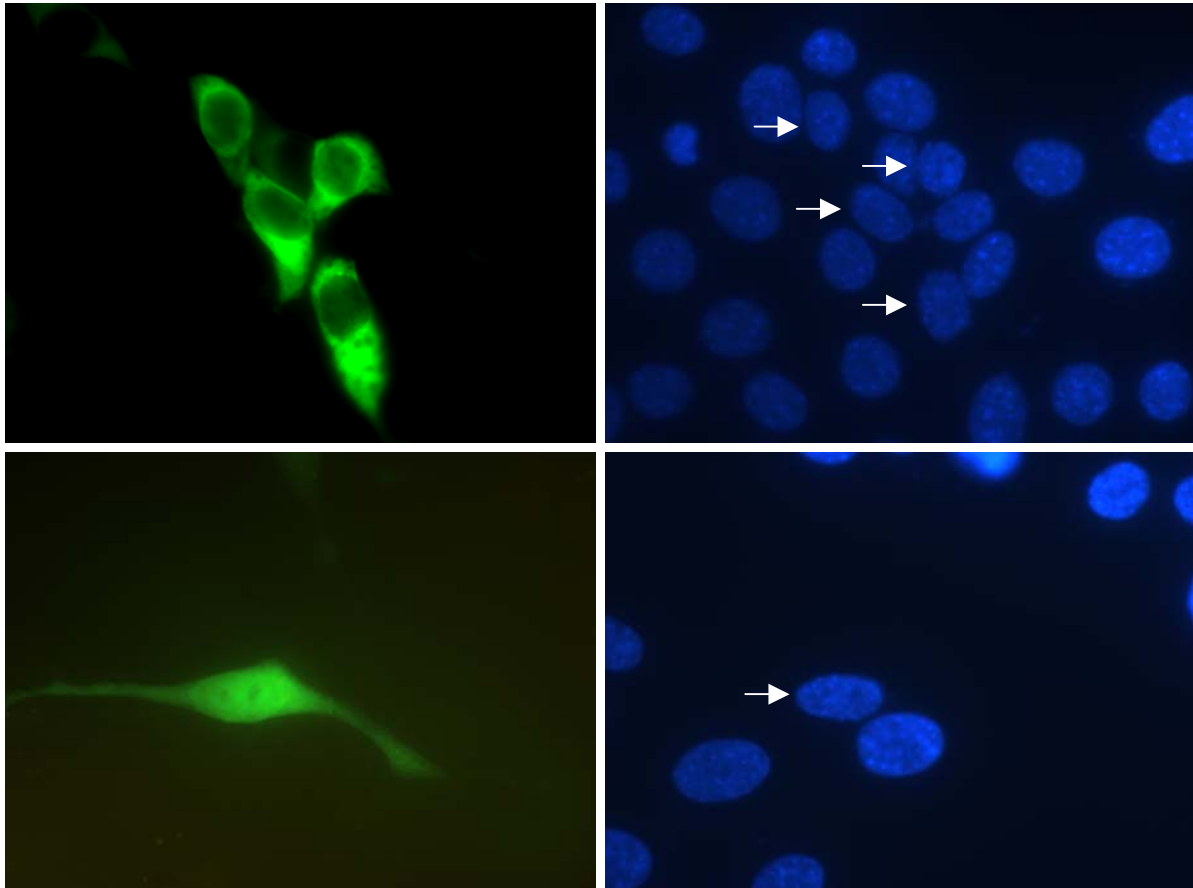
molog zur chromosomalen Lokalisation des orthologen Maus-Gens, dass auf Chromosom 1 in der Region C lokalisiert wurde.



**Abb. 37** Darstellung der genomischen Organisation des humanen NIF3L1-Gens nach einem Vergleich mit dem humanen genomischen Klon NH0469M07 (Accession Nr. AC005037). Exons sind als schwarze Rechtecke gezeichnet und Introns sind als schwarze Linien dargestellt. Die Größen der Exons bzw. Introns in bp sind als Zahlen angegeben. Die Position des Translations-Startkodons bzw. -Stopkodons sowie die Position des STS (sequence tagged site)-Markers sind eingezeichnet. Das humane NIF3L1-Gen umfasst sieben Exons und das gesamte Gen umspannt ungefähr 14.5 kb genomischer Sequenz.

#### 6.4 Zelluläre Lokalisation des NIF3L1-GFP-Fusionsproteins in Säugerzellen

Für die zelluläre Lokalisation von NIF3L1 wurde der komplette offene Leserahmen von NIF3L1 (1128 bp) an den C-Terminus des GFP-(„green fluorescent protein“) in den pECFP-C1-Vektor (Clontech) inkloniert. Maus-NIH3T3-Fibroblasten wurden transient mit dem o.g. Konstrukt transfiziert. Als Positivkontrolle wurde der pECFP-C1-Vektor ohne Insert transfiziert. Die Transfektion erfolgte auf speziellen Objektträgern mit angehefteter Kulturflasche (Nunc, Wiesbaden). Nach 24 h wurden die transfizierten Maus-NIH3T3-Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop (BX-60, Olympus) untersucht. Humanes NIF3L1 konnte ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert werden (Abb. 38). Dies ist in Übereinstimmung mit der theoretischen Vorhersage der zellulären Lokalisation von NIF3L1 durch das Computerprogramm PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/psort/helpwww2.html>), welches kein putatives Kernlokalisierungssignal innerhalb der NIF3L1-Sequenz detektierte und das Protein mit einer 70%igen Wahrscheinlichkeit im Zytoplasma vorhersagt.



**Abb. 38** Darstellung der zellulären Lokalisation des humanen NIF3L1-Proteins in Säugerzellen. Maus-NIH3T3-Fibroblasten wurden mit einem pECFP-C1-NIF3L1-Fusionskonstrukt transient transfiziert. **(A)** Untersuchungen unter einem Fluoreszenzmikroskop zeigten eine zelluläre Lokalisation von NIF3L1 im Zytoplasma. **(B)** Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. **(C)** Als Positivkontrolle wurden die Maus-NIH3T3-Zellen mit dem leeren pECFP-C1-Vektor transfiziert. **(D)** DAPI-Gegenfärbung der mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen.

## 7. Screening einer HeLa-cDNA-Bibliothek unter Verwendung des Yeast-Two-Hybrid-Systems

Ein Aminosäuresequenzvergleich von NIF3L1 mit homologen Proteinen anderer Spezies zeigte die Existenz zweier konservierter Domänen, die jeweils am N-Terminus und am C-Terminus des Proteins lokalisiert sind (IV. 4.2). Die Funktion dieser konservierten Domänen ist unbekannt. Um mögliche Bindungspartner und damit auch die zelluläre Signaltransduktion

von NIF3L1 näher zu evaluieren, wurden Interaktionspartner von NIF3L1 unter Verwendung des Yeast-Two-Hybrid-Systems gesucht.

#### **7.1 Bestimmung der Transformationseffizienz und der Anzahl der getesteten Klone**

Das „Screenen“ der HeLa cDNA-Bibliothek wurde insgesamt in drei „large scale“-Transformationen durchgeführt. Dabei wurden jeweils 16 µg cDNA-Bibliothek eingesetzt und in den Hefestamm CG-1945-pGBT9-NIF3L1 transformiert. Die Gesamtzahl der dabei getesteten cDNA-Klone ergab sich aus der Transformationseffizienz der drei Einzelversuche. Die Transformationseffizienz wurde mit Hilfe der Kontrollausstriche auf SD/-Leu-Trp-Nährböden, auf denen alle doppelt transformierten Hefezellen Kolonien bildeten, berechnet.

$$\text{Transformationseffizienz} = (\text{cfu}/\mu\text{g transformierter DNA}) \times (V_{\text{ges}}/V_{\text{Probe}})$$

cfu = colony formig units (auf SD/-Leu-Trp-Nährboden)

$V_{\text{Ges}}$  = Gesamtvolumen des Transformationsansatzes

$V_{\text{Probe}}$  = Kontrollausstrich-Volumen

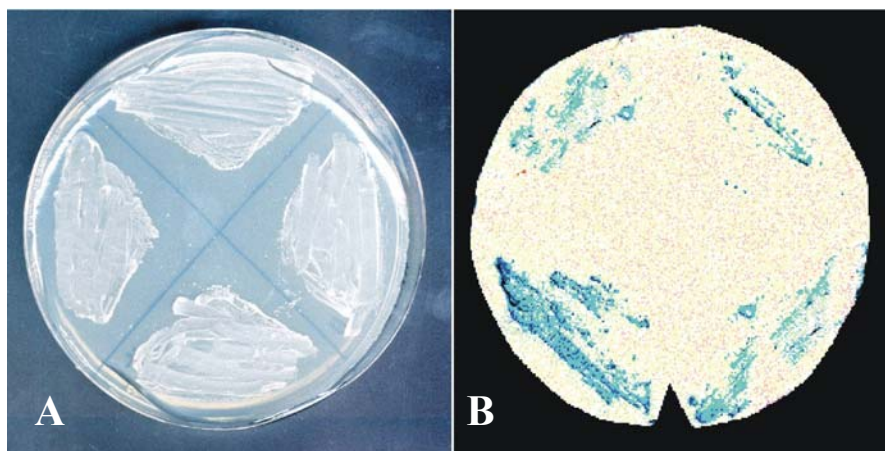
$$\text{Zahl der getesteten Klone} = \text{cfu} \times (V_{\text{Ges}}/V_{\text{Probe}})$$

Insgesamt wurden in den drei durchgeführten Ansätzen ca.  $1.4 \times 10^6$  Transformanten „gescreent“.

#### **7.2 Identifikation von HIS3- und lacZ- positiven Hefetransformanten**

Die mit den beiden Plasmiden pGBT9-NIF3L1 und pGAD-GH/cDNA-Bibliothek transformierten CG-1945-Hefezellen wurden zur Identifikation von HIS3-positiven Transformanten auf Selektivnährböden ausgestrichen, denen neben den Aminosäuren Leucin und Tryptophan auch die Aminosäure Histidin fehlte (SD-Leu-Trp-His). CG-1945-Hefezellen sind Histidin-auxotroph. Kommt es jedoch zu einer spezifischen Interaktion zwischen NIF3L1 und einem Protein der Bibliothek, so führt dies zur Rekonstitution des Transaktivator-Komplexes. Infolge

dessen wird die Transkription und Expression des Reportergens HIS3 angeregt. Es bilden sich Kolonien, die Histidin-prototroph sind. Insgesamt wuchsen 31 Kolonien auf SD/-Leu-Trp-His- Nährbödenplatten heran (Abb. 39A). Alle 31 Hefekolonien, die aus der Histidin-Selektion auf Mangel-Nährböden hervorgegangen waren, wurden einem zweiten Selektionsverfahren, dem  $\beta$ -Galactosidase-Test unterzogen. Mit diesem Verfahren wurde die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase bzw. die Expression des lacZ-Reportergens geprüft. Die Aktivierung des lacZ-Reportergens geschieht analog zur Aktivierung des HIS3-Reportergens. Von den 31 HIS3-positiven Transformanten konnten 9 Klone identifiziert werden, bei denen eine  $\beta$ -Galactosidasefärbung positiv war (Abb. 39B).



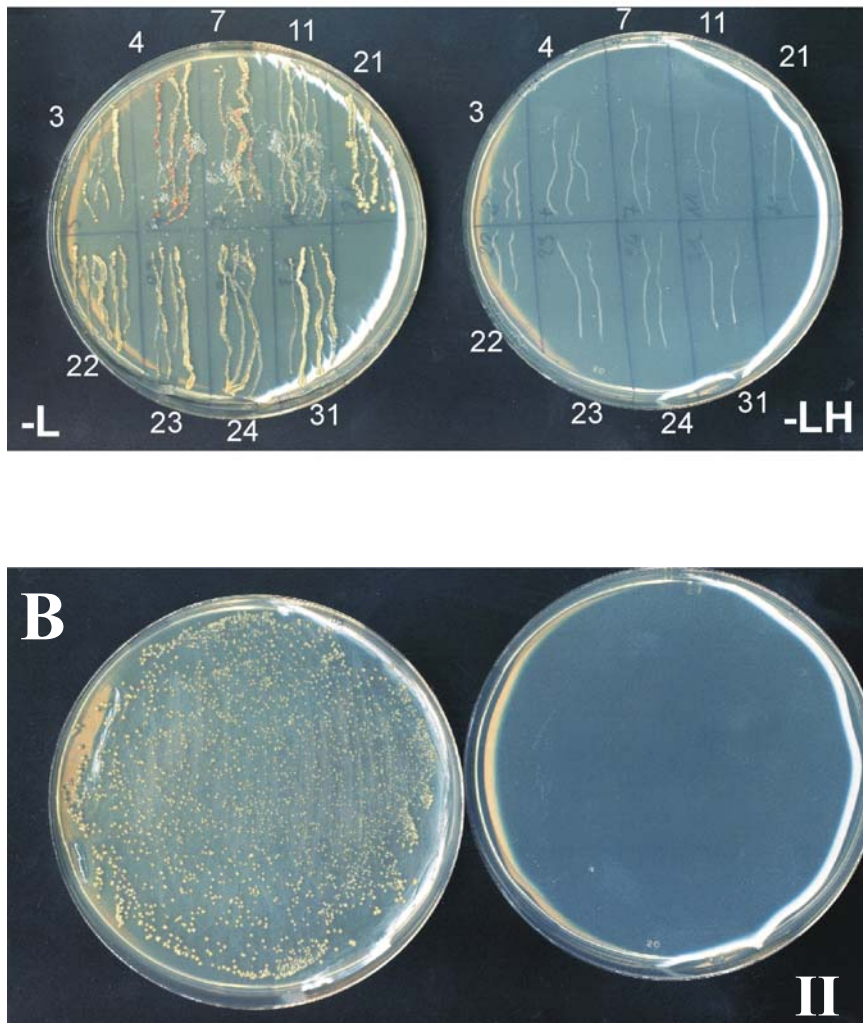
**Abb. 39** Exemplarische Darstellung von 4 positiven Hefe-Klonen, bei denen es infolge einer Interaktion zur Expression beider Reportergene (HIS3 und lacZ) kommt. **(A)** Positives-Wachstum auf SD-Leu-Trp-His-Nährmedium. **(B)** Positiver  $\beta$ -Gal-Assay.

### 7.3 Verifikation positiver Klone durch Segregation

Um auszuschließen, dass die Aktivierung der Reportergene in den 9 HIS3/lacZ-positiven Klonen allein durch das Aktivierungsdomäne (AD)-Fusionsprotein und ohne den Interaktionspartner hervorgerufen wird, wurden die Klone nach Elimination des DNA-BD-Plasmids auf SD/-Leu-His-Nährbodenplatten ausgestrichen. Keiner der neun isolierten Klone wuchs dabei auf den Mangelplatten (Abb. 40A). Damit wurde ausgeschlossen, dass die Aktivierung der Reportergene allein durch das AD-Fusionsprotein hervorgerufen wurde. Zusätzlich wurden die erzeugten Segreganten CG-1945-AD-Fusionsprotein in separaten Ansätzen einmal mit dem leeren Plasmid pGBT9 (Abb. 40B (II)), das die DNA-BD enthält, sowie einmal mit



dem Konstrukt pGBT9-NIF3L1 (Abb. 40B (I)) transformiert und auf SD-Leu-Trp-His-Nährbödenplatten ausgestrichen. Dabei wuchsen ausschließlich Kolonien mit der Kombination CG-1945-AD-Fusionsprotein/pGBT9-NIF3L1 (Abb. 40B (I)). Mithilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems wurden also neun cDNA-Klone identifiziert, die für Polypeptide kodieren, welche in Hefezellen spezifisch mit NIF3L1 interagieren.



**Abb. 40** Verifikation positiver Klone durch Erzeugung von Segreganten. (A) Die erzeugten Segreganten, die lediglich das AD-Fusionsprotein tragen, wurden separat auf SD/-Leu-His -Nährbödenplatten ausgestrichen. Keiner der neun isolierten Klone wuchs dabei auf den Mangelplatten. Somit zeigt sich, dass in den 9 HIS3/lacZ-positiven Klonen das AD-Fusionsprotein allein keinen Einfluss auf die Aktivierung der Reportergene besitzt. (B) Die erzeugten Segreganten CG-1945-AD-Fusionsprotein wurden in separaten Ansätzen einmal mit dem leeren Plasmid pGBT9 (II), das die DNA-BD enthält, sowie einmal mit dem Konstrukt pGBT9-NIF3L1 (I) transformiert und auf SD-Leu-Trp-His-Nährbödenplatten ausgestrichen. Dabei wuchsen in jedem Fall ausschließlich

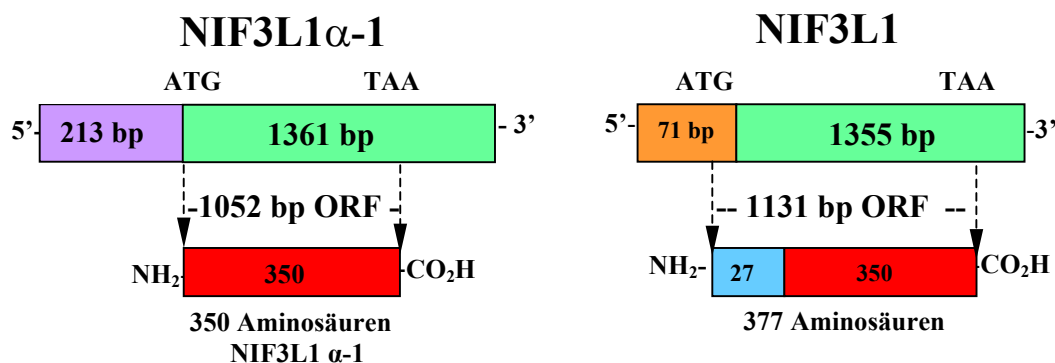
Kolonien bei der Kombination CG-1945-AD-Fusionsprotein/pGBT9-NIF3L1 (I). Exemplarisch ist dies hier für den Hefe-Klon Nr.3 dargestellt.

#### 7.4 Identifizierung der isolierten cDNA-Klone

Aus den Segreganten CG-1945-pGAD GH-AD-cDNA-Bibliothek wurde die Plasmid DNA-isoliert. Um die isolierte Plasmid-DNA, deren Ausbeute minimal war, in Bakterien rezutransformieren, wurde zunächst mit vektorspezifischen Primern (Y2H2 und Y2HAD3') unter Verwendung der isolierten Plasmid DNA als Template eine PCR angesetzt. Die amplifizierten Fragmente wurden in den pGEM-T-Vektor (Promega, Madison, WI) subkloniert und von beiden Richtungen her sequenziert. Die Sequenzen wurden mit dem BLAST-Programm (Altschul et al., 1990) analysiert.

##### NIF3L1 $\alpha$ -1:

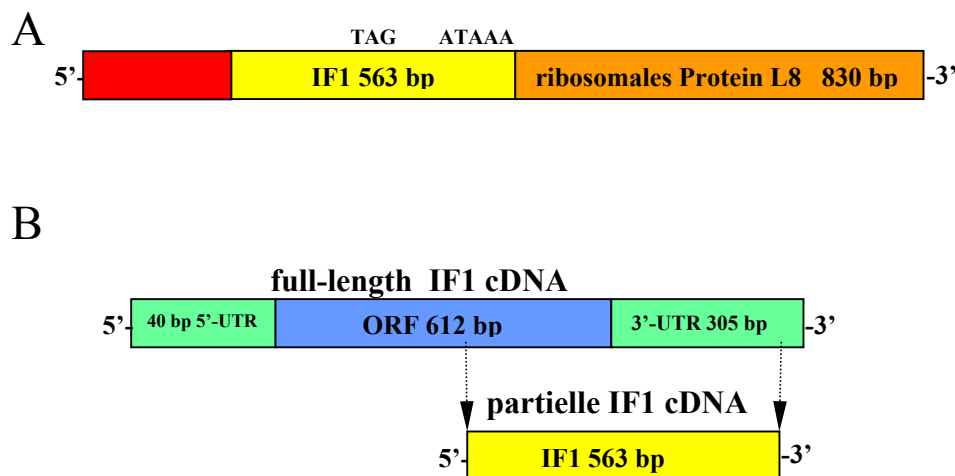
Es zeigte sich, dass von den 9 isolierten cDNA-Klonen 4 cDNA-Klone für eine 1.4 kb große Spleißvariante des NIF3L1-Gens kodieren. Diese wurde im weiteren Verlauf mit NIF3L1 $\alpha$ -1 bezeichnet. Die vollständige Sequenz ist in den öffentlichen Datenbanken unter der Accession Nr. AK023378 registriert. Die Spleißvariante NIF3L1 $\alpha$ -1 kennzeichnet sich dadurch aus, dass im 5'-Bereich des Gens eine 213 bp große Region alternativ gespleißt wird. Dies führt letztlich zu der Bildung eines trunkierten Proteins mit einer Größe von 350 Aminosäuren. Die 27 Aminosäuren am N-Terminus von NIF3L1 fehlen bei der Spleißvariante NIF3L1 $\alpha$ -1 (Abb. 41).



**Abb. 41** Schematische Darstellung der Spleißvariante NIF3L1 $\alpha$ -1. Eine 213 bp große Region in der 5'-Region des Gens wird alternativ gespleißt, wodurch ein verkürzter offener Leserahmen (ORF) von 1052 bp entsteht. Dieser kodiert für ein trunkiertes Protein von 350 Aminosäuren.

**IF1:**

Die restlichen 5 cDNA-Klone beinhalteten ebenfalls eine identische cDNA-Sequenz. Die isolierte 1.5 kb große cDNA-Sequenz umfasst zwei zusammengesetzte Klone. Unmittelbar hinter der GAL4-AD befindet sich eine 563 bp große cDNA, die für den C-Terminus eines unbekanntes 204 Aminosäuren großen Proteins kodiert, das in den öffentlichen Datenbanken unter der Registriernummer AK027098 eingetragen ist (Abb. 42A-C). Diese partielle, 563 bp große cDNA-Sequenz umfasst 303 bp eines offenen Leserahmens, der mit dem Stopkodon TAG abschließt sowie 260 bp einer 3'-untranslatierten Region. Das abgeleitete Protein wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen als IF1 (Interacting factor 1) bezeichnet. Direkt hinter der cDNA-Sequenz von IF1 schließt sich eine weitere cDNA Sequenz an, die für ein ribosomales Protein L8 (Accession Nr. z28407) von 257 Aminosäuren kodiert (Abb. 42A). Diese cDNA Sequenz befindet sich jedoch nicht im Leserahmen zur GAL4-AD und wurde aufgrund des vorgelagerten Stopkodons der IF1-Sequenz auch nicht exprimiert. Das ribosomale Protein L8 ist somit für die gefundene Interaktion nicht verantwortlich und wurde daher auch nicht weiter bearbeitet. Die „full-length“ cDNA-Sequenz von IF1 wird in Abschnitt 10 behandelt.



**Abb. 42** (A) Schematische Darstellung des zusammengesetzten Klon, der aus der Hefe isoliert wurde (pGEM-T-IF1). Die IF1-cDNA Sequenz folgt unmittelbar hinter der GAL4 AD. Darüber hinaus befindet sich die IF1-Sequenz im Leserahmen relativ zur translatierten GAL4-AD. (B) Schematische Darstellung der humanen „full-length“ IF1 cDNA, die in den öffentlichen Datenbanken unter der Accession Nr. AK027098 registriert ist. Es ist auch die partielle IF1 cDNA-Sequenz (563 bp) angegeben, die aus der HeLa cDNA-Bibliothek isoliert wurde.

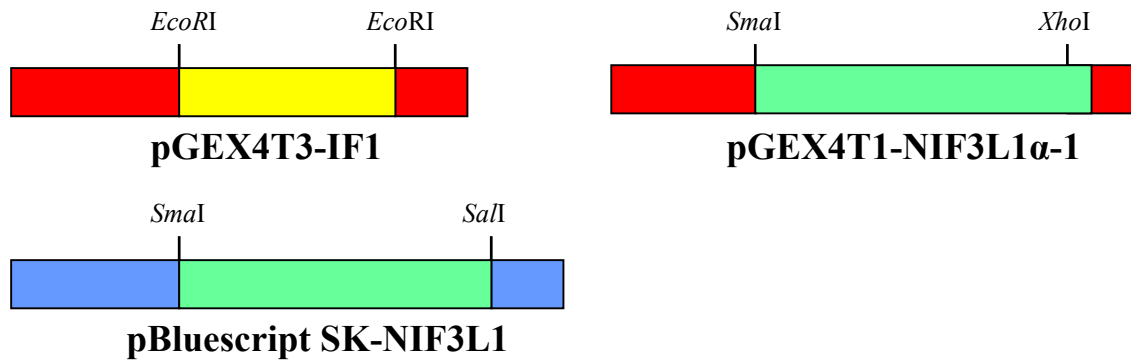
## 8. GST-Pulldown

GST-Pulldown-Experimente wurden durchgeführt, um die im Yeast-Two-Hybrid-System gefundenen Interaktionen in einem weiteren unabhängigen System zu verifizieren. Hierbei wurde das „Bait“-Protein NIF3L1 *in vitro* translatiert und dabei radioaktiv markiert. Die mutmaßlich interagierenden Proteine NIF3L1 $\alpha$ -1 und IF1 wurden als Fusionsproteine mit der GST (Glutathion-S-Transferase) exprimiert. Die GST-Fusionsproteine wurden affinitätschromatografisch aufgereinigt. Anschließend wurden das radioaktiv markierte NIF3L1 und die aufgereinigten Fusionsproteine *in vitro* inkubiert.

### 8.1 Generierung der Fusionskonstrukte

Die in den pGEM-T-Vektor (Promega) subklonierten cDNA-Klone GAL4-AD-NIF3L1 $\alpha$ -1 und GAL4-AD-IF1 wurden für den GST-Pulldown in pGEX-4T-Vektoren (Amersham) umkloniert, um sie in Bakterien als Fusion mit der Glutathion-S-Transferase induziert zu exprimieren. Es wurden dafür pGEX4T1- und pGEX4T3-Vektoren benutzt, die sich allein durch den Leserahmen des Polylinkers voneinander unterscheiden. Für das Fusionskonstrukt GST-IF1 wurde das am 3'-Ende der IF1 cDNA lokalisierte, 563 bp-Fragment verwendet, das aus der HeLa cDNA-Bibliothek isoliert wurde. Das Umklonierungsverfahren ist in Abb. 43 dargestellt. Alle hergestellten Konstrukte wurden zur Kontrolle mit dem Primer pGEX5' über die Insertionsstellen hinweg sequenziert. Die *in vitro* Translation mit Hilfe des Retikulozytenlysates erfolgte mit dem Konstrukt pBluescript SK-NIF3L1, wobei der vollständige offene Leserahmen von NIF3L1 unter der Kontrolle des T3-Promotors steht.

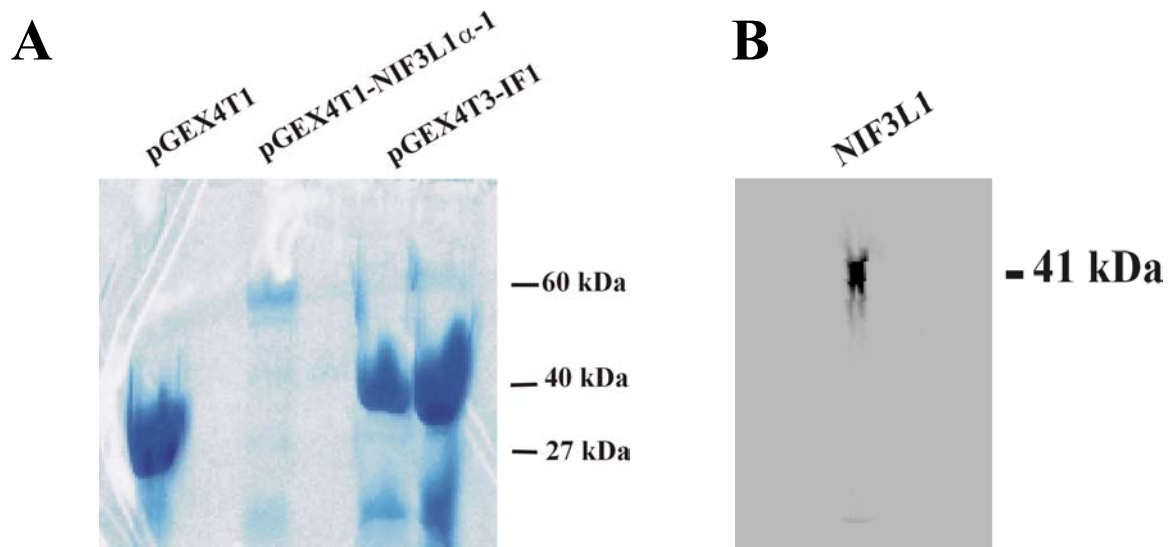
cDNA-Klon:	Exzision durch:	Klonierung in:
pGEM-T GAL4 AD-NIF3L1 $\alpha$ -1	<i>Sma</i> I / <i>Xho</i> I	pGEX4T1 ( <i>Sma</i> I / <i>Xho</i> I)
pGEM-T GAL4 AD-IF1	<i>Eco</i> RI	pGEX4T3 ( <i>Eco</i> RI)
pGBT9-NIF3L1	<i>Sma</i> I/ <i>Sa</i> II	pBluescript SK ( <i>Sma</i> I/ <i>Sa</i> II)



**Abb. 43** Darstellung des Umklonierungsverfahrens und schematische Darstellung der generierten Fusionskonstrukte pGEX4T3-IF1, pGEX4T1-NIF3L1 $\alpha$ -1 sowie pBluescript SK-NIF3L1.

## 8.2 Expression der GST-Fusionsproteine und *in vitro* Translation von NIF3L1

Nach der Expression der Fusionsproteine GST-NIF3L1 $\alpha$ -1 und GST-IF1 in Bakterien und ihrer affinitätschromatografischen Aufreinigung über eine Glutathion-gekoppelte Sepharose-Matrix, wurden die Proteine zunächst in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert und überprüft, bevor sie für den Pulldown eingesetzt wurden (Abb. 44A). Ferner wurde das Konstrukt pBluescript SK-NIF3L1 für eine radioaktiv markierte *in vitro* Translation eingesetzt. Die *in vitro* Translation wurde mit Hilfe des TNT-Retikulozytenlysates unter Verwendung von radioaktivem  $^{35}\text{S}$ -Methionin durchgeführt. Für die Transkription wurde die T3-Polymerase verwendet. Zur Analyse und Überprüfung des *in vitro*-exprimierten Proteins wurde das Produkt, bevor es für den Pulldown eingesetzt wurde, zunächst in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Autoradiografie identifiziert (Abb. 44B).

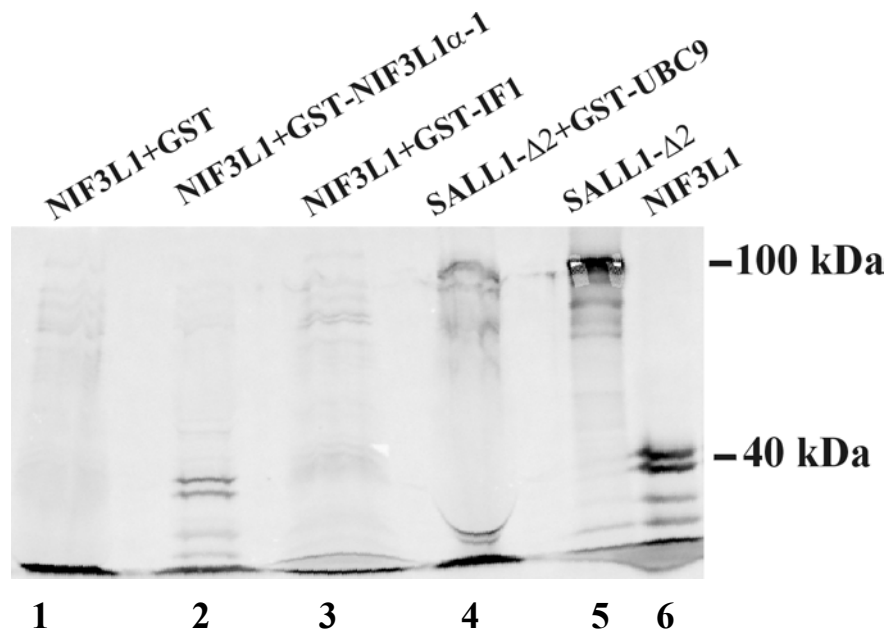


**Abb. 44** Darstellung der Expression der GST-Fusionsproteine sowie der NIF3L1 *in vitro* Translation. **(A)** Aufgereinigte GST-Fusionsproteine sowie GST ohne Fusionspartner wurden in *Escherichia coli* BL-21 exprimiert. GST besitzt eine molekulare Masse von 27 kDa, das Fusionsprotein GST-IF1 besitzt eine molekulare Masse von 40 kDa, und das Fusionsprotein GST-NIF3L1 $\alpha$ -1 besitzt eine molekulare Masse von 60 kDa. **(B)** Die *in vitro* Translation von NIF3L1 führte zur Synthese eines 41 kDa Proteins, das nach einer Auftrennung in einer SDS-Page über Autoradiografie identifiziert wurde.

### 8.3 GST-Pulldown

Die in der Elektrophorese überprüften und an der Sepharose gebundenen Fusionsproteine GST-IF1 und GST-NIF3L1 $\alpha$ -1, sowie als Kontrolle GST-Protein allein, wurden jeweils mit dem *in vitro* exprimierten NIF3L1 inkubiert. Danach folgten mehrere Waschriffe. Zur Verifikation einer möglichen Interaktion wurden die Produkte in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Autoradiografie identifiziert. Bei einer vorhandenen Interaktion sollte das *in vitro* translatierte und radioaktiv markierte Protein NIF3L1 (trotz der vollzogenen Waschriffe) an das Fusionsprotein GST-IF1 bzw. GST-NIF3L1 $\alpha$ -1 gebunden bleiben. Nach einer Auftrennung des Komplexes in einer SDS-PAGE sollte bei einer vorhandenen Interaktion das *in vitro* translatierte und radioaktiv markierte NIF3L1-Protein in einer anschließenden Autoradiografie identifiziert werden können.

In dem durchgeführten GST-Pulldown konnte eine Interaktion zwischen NIF3L1 und seiner homologen Spleißvariante NIF3L1 $\alpha$ -1 nachgewiesen werden (Abb. 45). Eine Interaktion zwischen IF1 und NIF3L1 konnte im GST-Pulldown nicht gezeigt werden. Als Positivkontrolle wurde das Fusionsprotein GST-UBC9 mit dem *in vitro* exprimierten SALL1- $\Delta$ 2 verwendet (Rieger, Institut für Humangenetik, Diplomarbeit 2001). Als Negativkontrolle wurde GST-Protein allein mit dem *in vitro* exprimierten NIF3L1 inkubiert (Abb. 45).



**Abb. 45** Darstellung der *in vitro* Interaktionsanalyse durch einen GST-Pulldown. Die Ansätze wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Fixierung und Trocknung des Gels erfolgte die Exposition des Röntgenfilms für 15 h bei RT. Als Positivkontrolle wurde der Ansatz SALL1- $\Delta$ 2 +GST-UBC9 verwendet, als Negativkontrolle der Ansatz NIF3L1+GST. Aufgetragen sind die vier Pulldown-Ansätze in den Spuren 1-4. Spur 5 und 6 sind reine *in vitro* Translationen: SALL1- $\Delta$ 2 (als eine Komponente der Positivkontrolle) und NIF3L1. In dem Ansatz NIF3L1+GST-NIF3L1 $\alpha$ -1 (Spur 2) ist deutlich erkennbar, dass eine Interaktion stattgefunden hat. Zwischen dem *in vitro* translatierten NIF3L1 und dem GST-IF1 Fusionsprotein konnte im GST-Pulldown keine Interaktion nachgewiesen werden.

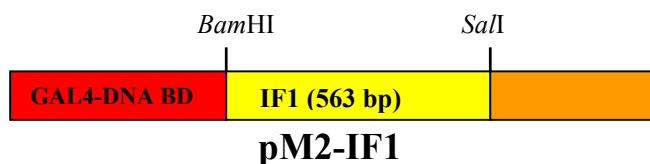
## 9. Mammalian-Two-Hybrid

Das Mammalian-Two-Hybrid wurde durchgeführt, um die im Yeast-Two-Hybrid gefundenen Interaktionen in einer weiteren unabhängigen Methode zu verifizieren.

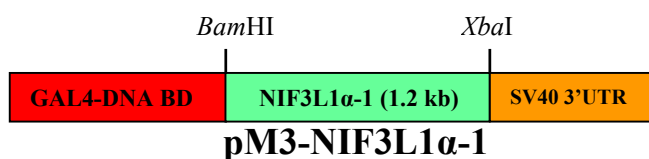
## 9.1 Generierung der Fusionskonstrukte

Als Voraussetzung für die Durchführung des Mammalian-Two-Hybrid-Systems mussten sowohl die aus der HeLa cDNA-Bibliothek stammenden Klone NIF3L1 $\alpha$ -1 und IF1 als auch die NIF3L1 cDNA in Säugetierexpressionsvektoren umkloniert werden. Die cDNAs für IF1 und NIF3L1 $\alpha$ -1 wurden dabei als Fusion mit der GAL4-DNA-BD in pM-Vektoren (Clontech) einkloniert. Die Transkription steht dabei unter der Kontrolle des SV40 frühen Promotors und die Transkriptionstermination wird durch eine vorhandene SV40 3'-untranslatierte Region kontrolliert. Der vollständige offene Leserahmen von NIF3L1 wurde als Fusion mit der Herpes Simplex Virus 16 Transaktivierungsdomäne in den pVPFlag5-Vektor (Clontech) einkloniert. Auch hier steht die Transkriptionsinitiierung bzw. -termination unter der Kontrolle des SV40 frühen Promotors bzw. der SV40 3'-untranslatierten Region. Sämtliche erstellten Konstrukte wurden entweder mit vektorspezifischen- oder mit genspezifischen Primern (pVPFlag5, pVPNIF3L1-For, pVPNIF3L1-Rev) komplett sequenziert. Nachfolgend wird die Klonierungsstrategie für die Herstellung der einzelnen Konstrukte beschrieben:

**pM2-IF1:** Das 592 bp große Insert von IF1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I aus dem pGEX4T3-IF1-Konstrukt herausgeschnitten und in den *Bam*HI/*Sal*I geschnittenen pM2-Vektor einkloniert.

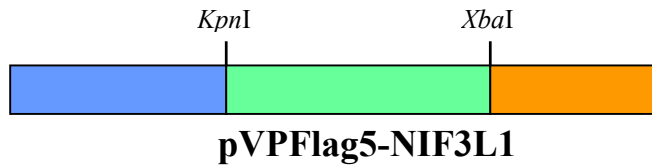


**pM3-NIF3L1 $\alpha$ -1:** Mittels PCR wurde mit den genspezifischen Primern (Y2H2 und pVP-NIF3L1Rev) eine NIF3L1 $\alpha$ -1 cDNA- Sequenz mit flankierenden Schnittstellen für *Bam*HI und *Xba*I amplifiziert. Als DNA-Template diente das Plasmid pGEM-T-GAL4 AD-NIF3L1 $\alpha$ -1. Das amplifizierte Produkt wurde *Bam*HI/*Xba*I in den pM3-Vektor einkloniert.





**pVPFlag5-NIF3L1:** Mittels PCR wurde mit den genspezifischen Primern pVP-NIF3L1-For und pVP-NIF3L1-Rev der vollständige offene Leserahmen für NIF3L1 mit den flankierenden Schnittstellen *KpnI* und *XbaI* amplifiziert. Als DNA-Template diente das Plasmid pBluescript SK-NIF3L1. Das amplifizierte Produkt wurde *KpnI/XbaI* in den pVPFlag5-Vektor inkloniert.



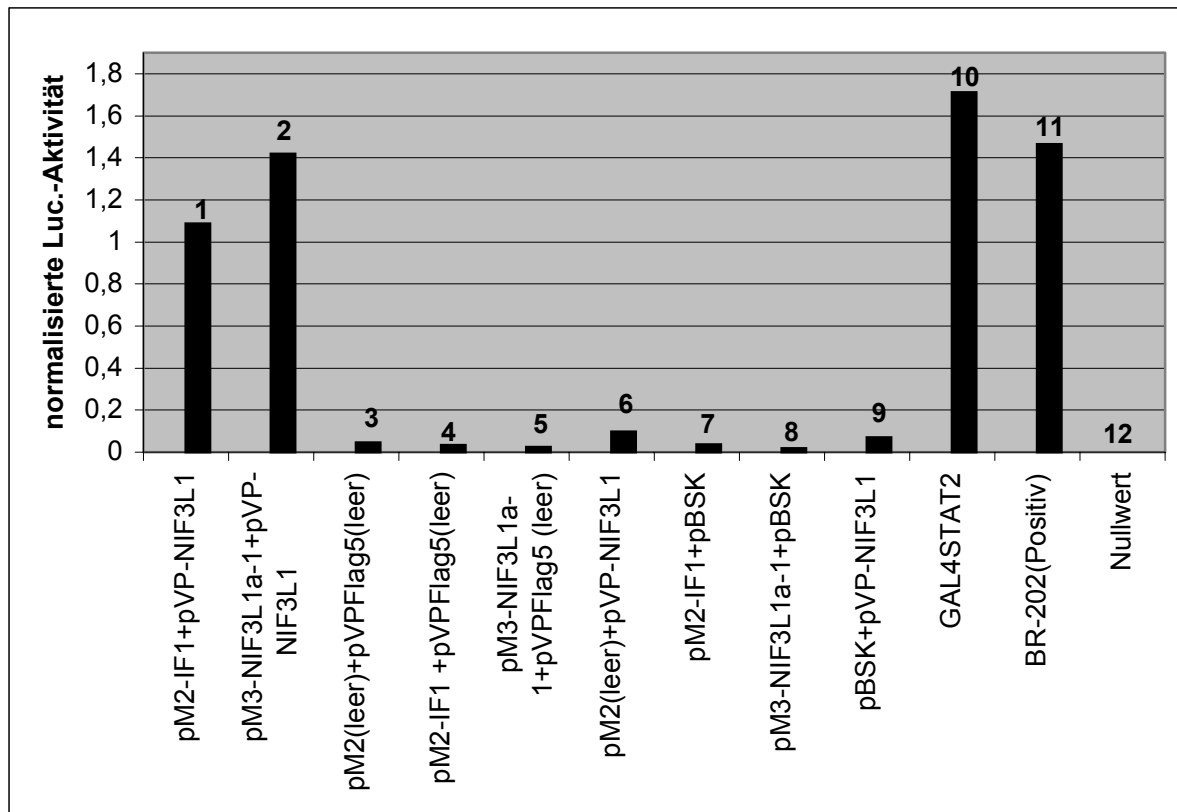
## 9.2 Transfektion der NIH3T3-Fibroblasten

Pro Transfektionsansatz wurden  $1.4 \times 10^5$  NIH3T3-Fibroblasten der Maus in sechs-Schalen-Platten mit insgesamt 1.6  $\mu\text{g}$  Plasmid DNA unter Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz transient transfiziert. Neben den beschriebenen pM- und pVPFlag5-Konstrukten kamen noch die Reporterplasmide (GAL4-LUC und pCMV- $\beta$ -Gal) und Positivkontrollen zum Einsatz. Als Positivkontrollen wurden die Plasmide GAL4/STAT2 sowie die Kombination pM1/BR-304 und pVP-HA/B202-NB verwendet. GAL4/STAT2 exprimiert einen zusammengesetzten funktionellen Transkriptionsaktivator, bestehend aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und der STAT2-Aktivierungsdomäne. In der Plasmidkombination pM1/BR-304 und pVP-HA/B202-NB sind DNA-Bindungsdomäne (GAL4-DNA-BD in pM1) und Aktivierungsdomäne (VP16 in pVP-HA) voneinander getrennt und werden erst durch die Interaktion der beiden Polypeptide BR-304, das einen Teil des BRCA1-Proteins enthält, und B202-NB, das einen Teil des BARD1-Proteins enthält, verbunden (Wu et al., 1996). Als Negativkontrollen wurden pM- und pVPFlag5-Vektoren ohne Inserts, pM2-IF1 bzw. pM3-NIF3L1 $\alpha$ -1 in Abwesenheit eines AD-Plasmids und pVPFlag5-NIF3L1 in Abwesenheit eines BD-Plasmids transient transfiziert. Zum Ausgleich der transfizierten DNA –Menge wurde jeweils pBluescript SK-Vektor verwendet. Die Transfektionsansätze und die Ergebnisse der luminometrischen Messungen sind in Tab. 5 und in Abb. 46 dargestellt.

### III. Ergebnisse

Transfektionsansatz	1	2	3
Menge der transfizierten Plasmide	0.5 µg pM2-IF1 0.5 µg pVP-NIF3L1 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal	0.5 µg pM3-NIF3L1α-1 0.5 µg pVP-NIF3L1 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal	0.5µg pM2-Vektor (leer) 0.5 µg pVPFlag5 (leer) 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal
Luciferase-Aktivität in RLU	469211	887952	35779
β-Gal.- Aktivität in RLU	431657	625319	773613
Normalisierte Luciferase-Aktivität	1,087	1,42	0,04625
Transfektionsansatz	4	5	6
Menge der transfizierten Plasmide	0.5 µg pM2-IF1 0.5 µg pVPFlag5 (leer) 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal	0.5 µg pM3-NIF3L1α-1 0.5 µg pVPFlag5 (leer) 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal	0.5 µg pM2 (leer) 0.5 µg pVP-NIF3L1 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal
Luciferase-Aktivität in RLU	29175	13831	45938
β-Gal.-Aktivität in RLU	845666	594910	466851
Normalisierte Luciferase-Aktivität	0,0345	0,02325	0,0984
Transfektionsansatz	7	8	9
Menge der transfizierten Plasmide	0.5 µg pM2-IF1 0.5 µg pBluescript SK 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal	0.5 µg pM3-NIF3L1α-1 0.5 µg pBluescript SK 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal	0.5 µg pBluescript SK 0.5 µg pVP-NIF3L1 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal
Luciferase-Aktivität in RLU	44827	10556	30984
β-Gal.-Aktivität in RLU	1269175	537211	446778
Normalisierte Luciferase-Aktivität	0,03532	0,01965	0,06935
Transfektionsansatz	10	11	12
Menge der transfizierten Plasmide	0.5 µg GAL4/STAT2 0.5 µg pBluescript SK 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal	0.5 µg pM1-BR-304 0.5 µg pVP-HA/B202-NB 0.5 µg GAL4-LUC 0.1 µg pCMV-β-Gal	Nullwert
Luciferase-Aktivität in RLU	1431827	721651	0
β-Gal.- Aktivität in RLU	837081	492259	3504
Normalisierte Luciferase-Aktivität	1,7105	1,466	0

**Tab. 5** Transfektionsansätze und gemessene Luciferase- und β-Galactosidase-Aktivitäten. (RLU = relative Lichteinheiten, normalisierte Luciferase-Aktivität =  $RLU_{LUC}/RLU_{\beta-Gal}$ ).



**Abb. 46** Ergebnis des Mammalian-Two-Hybrid-Experiments zur Verifikation der Proteininteraktion zwischen NIF3L1 und IF1 (1) bzw. zwischen NIF3L1 und NIF3L1 $\alpha$ -1 (2). Als Positivkontrollen wurden die Plasmide GAL4/STAT2 sowie die Kombination pM1/BR-304 und pVP-HA/B202-NB verwendet (10,11). Als Negativkontrollen wurden pM- und pVPFlag5-Vektoren ohne Inserts, pM2-IF1 bzw. pM3-NIF3L1 $\alpha$ -1 in Abwesenheit eines AD-Plasmids und pVPFlag5-NIF3L1 in Abwesenheit eines BD-Plasmids transient transfiziert (3-9). Deutlich erkennbar ist die signifikante Zunahme der Luciferase-Aktivität bei den Kombinationen pM2-IF1+pVP-NIF3L1 (1) bzw. pM3-NIF3L1 $\alpha$ -1+pVP-NIF3L1 (2).

Aus dem Mammalian-Two-Hybrid Experiment wird deutlich, dass die Coexpression des Fusionsproteins VP16 AD-NIF3L1 mit jeweils einem der beiden Fusionsproteine GAL4 DNA-BD-NIF3L1 $\alpha$ -1 bzw. GAL4 DNA-BD-IF1 in Maus NIH3T3 –Fibroblasten zu einer signifikanten Zunahme der Expression des Reportergens Luciferase führt. Die Luciferase-Aktivität liegt dabei deutlich über den Negativkontrollen. Jede Transfektion wurde dabei im Duplikat ausgeführt und mindestens in zwei unabhängigen Ansätzen wiederholt. Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die im Yeast-Two-Hybrid gefundenen Interaktionen im Mammalian-Two-Hybrid reproduzierbar sind.





```

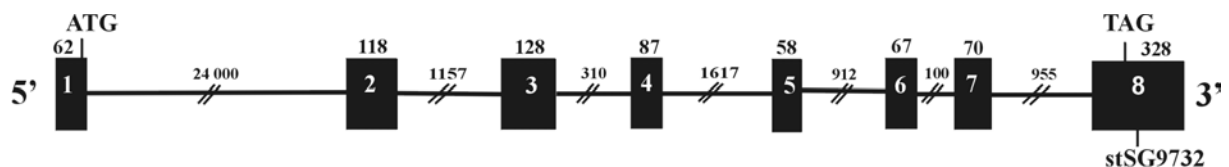
      H I T E S V E D K L E L R R K
533 CAATTTACGTTCTTCTTAGTACCATCCATGAACTTCAACAGACA
      Q F H V L L S T I H E L Q Q T
578 TTGGAGAATGATGACAAGCTGTGAGAGGTGGATGAAAGCTCAAGAA
      L E N D D K L S E V D E A Q E
623 AGCACCATGGAAGCAGACCCTAAGCCGTAGatgggctgcccgctcg
      S T M E A D P K P *
668 ccatttacagggacagcgaatagctgtctgggcttcctgggttca
713 gtgtgttgtacttttgggatatttcaacttcagcattgaagtact
758 ttgctttcaagtattcatgtgtcgttcatatttcttccagaacgg
803 aaatgtatcccatatatatgtatttttttaatacatttttatcct
848 taaacatagaaatcagcatctgaaaatatttataaaaatgtctcaaggc

```

**Abb. 48** Darstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Maus-homologen Ifi cDNA. Das Translations-Startkodon bzw. -Stopkodon ist hervorgehoben dargestellt. Das Polyadenylierungssignal (AATAAA) ist unterstrichen dargestellt. Die charakteristische GCC-Wiederholungssequenz in der 5-UTR ist grau-schattiert dargestellt.

## 10.2 Genomische Struktur und chromosomale Lokalisation von IF1

Datenbankrecherchen zeigten eine partielle humane genomische Sequenz des Chromosoms 3 in den öffentlichen Datenbanken (Accession Nr. NT\_005999.3), die die gesamte genomische Sequenz des humanen IF1-Gens umfasst. Durch einen Vergleich der cDNA-Sequenz von IF1 mit dieser humanen genomischen Sequenz, lässt sich die Organisation des IF1-Gens aufklären. Das IF1-Gen besteht aus insgesamt acht Exons und sieben Introns. Das vollständige IF1-Gen umspannt eine genomische Sequenz von ca. 30 kb (Abb. 49). Unter Verwendung elektronischer PCR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/epcr.cgi>) (II.6.7) (Schuler et al., 1998) konnte in der IF1-cDNA-Sequenz der STS-Marker stSG9732 gefunden werden. Dieser Marker ist chromosomal auf Chromosom 3p14.1 lokalisiert, im Intervall D3S1289-D3S1547 (69.1-77.4 cM).

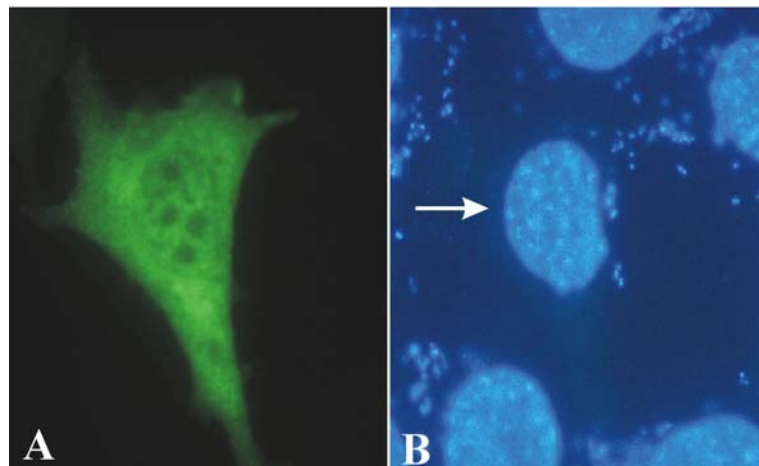


**Abb. 49** Darstellung der genomischen Organisation des humanen IF1-Gens nach einem Vergleich mit der humanen genomischen Sequenz von Chromosom 3 (Accession Nr. NT\_005999.3). Exons sind als schwarze Rechtecke gezeichnet und Introns sind als schwarze Linien dargestellt. Die Größe der Exons bzw. Introns in bp sind

als Zahlen angegeben. Die Position des Translations-Startkodons bzw. -Stopkodons sowie die Position des STS (sequence tagged site)-Markers sind eingezeichnet. Das humane IF1-Gen umfasst acht Exons und das gesamte Gen umspannt ungefähr 30 kb genomische Sequenz.

#### 10.3 Zelluläre Lokalisation des IF1-GFP-Fusionsproteins in Säugerzellen

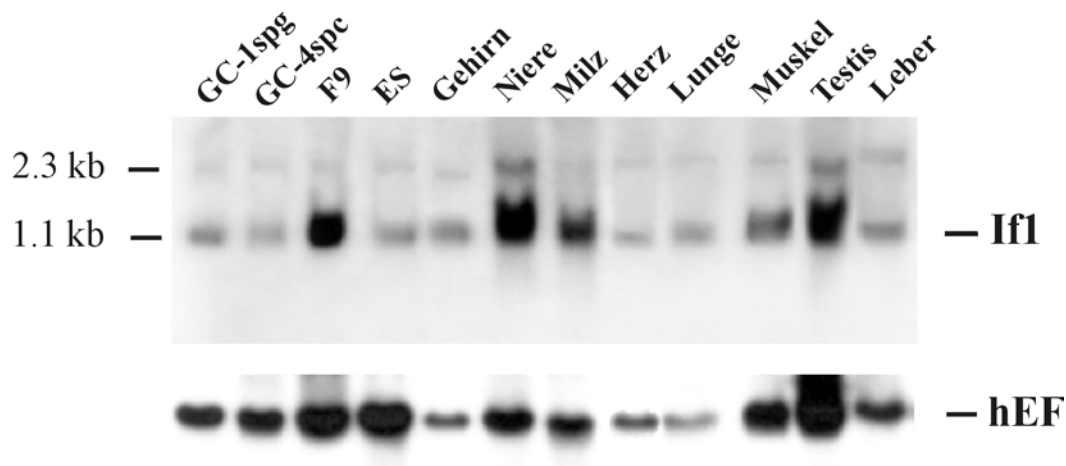
Für die zelluläre Lokalisation von IF1 wurde der komplette offene Leserahmen von IF1 (614 bp) an den C-Terminus des GFP-(„green fluorescent protein“) ligiert und in den pECFP-C1-Vektor (Clontech) inkloniert. Das erstellte Konstrukt wurde vollständig sequenziert. Maus-NIH3T3-Fibroblasten wurden transient mit dem o.g. Konstrukt transfiziert. Als Positivkontrolle wurde der pECFP-C1-Vektor ohne Insert transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie unter (II. 9.2.1) beschrieben. Nach 24 h wurden die transfizierten Maus-NIH3T3-Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop (BX-60, Olympus) untersucht. Das humane IF1-Protein konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert werden (Abb. 50). Die Aminosäuresequenz von IF1 beinhaltet kein Kernlokalisierungssignal. Eine theoretische Vorhersage der zellulären Lokalisation von IF1 durch das Computerprogramm PSORT II (II. 6.7) berechnet das Protein mit einer 70% igen Wahrscheinlichkeit im Nukleus.



**Abb. 50** Darstellung der zellulären Lokalisation des humanen IF1-Proteins in Säugerzellen. Maus-NIH3T3-Fibroblastenzellen wurden mit einem pECFP-C1-IF1-Fusionskonstrukt transient transfiziert. **(A)** Untersuchungen unter einem Fluoreszenzmikroskop zeigen eine zelluläre Lokalisation von IF1 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. **(B)** Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

#### 10.4 Expressionsanalyse des Maus-homologen If1

Northern Blot-Analysen mit jeweils 20 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der adulten Maus sowie RNA aus GC-1spg-, GC-4spc-, F9- und embryonalen Stammzellen zeigten ein ubiquitäres Transkript von If1 bei ca. 1.1 kb sowie ein weiteres relativ schwächer exprimiertes Transkript bei ca. 2.3 kb (Abb. 51). Eine Überexpression in der GC-1spg Zelle analog zum Nif3l1 konnte nicht festgestellt werden. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurde der Northern Blot mit einer spezifischen hEF cDNA- Sonde rehybridisiert. Die ubiquitäre Expression im Northern Blot steht im Einklang mit dem Expressionsmuster der Maus If1- bzw. der menschlichen IF1 cDNA-Sequenz in den EST-Datenbanken.



**Abb. 51** Northern Blot-Analyse mit 20 µg isolierter Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der adulten Maus sowie RNA aus GC-1spg-, GC-4spc-, F9- und embryonalen Stammzellen (ES) zeigten ein ubiquitäres Transkript von If1 bei ca. 1.1 kb sowie ein weiteres relativ schwächer exprimiertes Transkript bei ca. 2.3 kb. Der Northern Blot wurde mit einer spezifischen If1 cDNA-Sonde der Maus hybridisiert. Zum Nachweis der Integrität der RNA wurde der Northern Blot mit einer spezifischen hEF cDNA-Sonde rehybridisiert.



## IV. Diskussion

### 1. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Potenz der Spermatozyten und Spermatogonien zur malignen Transformation untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein experimenteller *in vivo*- sowie ein experimenteller *in vitro* Ansatz gewählt. In dem experimentellen *in vivo* Ansatz sollte untersucht werden, ob transgene Mäuse durch die stadienspezifische Expression des SV40 large T Antigens (LTA) in Spermatozyten bzw. Spermatogonien maligne transformiert werden können.

Für eine stadienspezifische Expression in den Spermatozyten wurden transgene Mäuse generiert, die das LTA unter der Kontrolle des humanen PGK2-Promotors exprimieren. Von diesen transgenen Mäusen wurden zunächst homozygote Linien aufgebaut. Northern Blot-Analysen zeigten eine testisspezifische Expression des Transgens LTA. Während der testikulären Entwicklung wurden das LTA-Transkript sowie das LTA-Protein erstmals ab dem 12. postnatalen Tag im Stadium der Präleptotänspermatozyten detektiert. Auch nach über 20 Monaten entwickelten sich weder im Testis noch in anderen Organen Tumoren. In 18- und 25 Tage alten PGK2-LTA transgenen Mäusen wurde im Vergleich zu Wildtypmäusen eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Spermatozyten beobachtet. In späteren Altersstadien näherte sich die erhöhte Spermatozytenzahl in den transgenen Mäusen an die Spermatozytenzahl in den Wildtypmäusen an. Sertoli-Zellen und Spermatiden zeigten keinen quantitativen Unterschied zu Wildtypmäusen. Darüber hinaus zeigten Apoptose-Untersuchungen eine signifikante Zunahme der Apoptoserate in 18 Tage alten PGK2-LTA transgenen Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypmäusen.

Für eine stadienspezifische Expression des LTA in den Spermatogonien wurden transgene Mäuse generiert, die das LTA unter der Kontrolle des humanen TSPY (testis-specific protein, Y-encoded)-Promotors exprimieren. Insgesamt konnten zwei transgene Linien etabliert werden, die das LTA bereits bei heterozygoten Mäusen im Testis exprimieren. RT-PCR-Analysen mit isolierter RNA aus verschiedenen Organen zeigten außerdem eine Expression in der Milz. In zwei unabhängigen transgenen Linien traten Tumore in der Sella turcica auf,

dabei handelt es sich vermutlich um Hypophysentumore. Diese werden zur Zeit von Dr. Schulz-Schaeffer, Abt. Neuropathologie, Universitätsklinikum Göttingen, untersucht. Die Untersuchungen der transgenen TSPY-LTA Mäuse sind noch nicht abgeschlossen.

In dem experimentellen *in vitro* Ansatz sollte die Potenz der Spermatozyten und Spermatogonien zur malignen Transformation unter Verwendung von immortalisierten Keimzelllinien untersucht werden. Zunächst wurde eine neue immortalisierte Spermatozytenzelllinie GC-4spc mit Hilfe des Promotor-basierten Selektionsverfahrens hergestellt. Die etablierte GC-4spc Zelllinie wächst adhärent und wurde bereits über mehr als 30 Generationen kultiviert. Chromosomale Analysen weisen einen normalen diploiden Karyotyp in der GC-4spc Zelllinie nach. Dies belegt gleichzeitig, dass die GC-4spc Zellen *in vitro* nicht weiter differenzieren. RT-PCR-Analysen ergaben eine Expression von Pgc2 und Proakrosin. Beides sind keimzellspezifische Marker für Spermatozyten (McCarrey et al., 1992; Nayernia et al., 1994). Außerdem konnte ein Transkript für das keimzellspezifische A-myb-Gen (Latham et al., 1996) nachgewiesen werden. Promotorstudien zeigten eine erhöhte Aktivität des humanen PGK2-Promotors in der GC-4spc Zelllinie. Aufgrund der Expressionsmuster dieser spezifischen Markergene wurde die GC-4spc Zelllinie einem Differenzierungsstadium zwischen den Präleptotänspermatozyten und den frühen Pachytänspermatozyten zugeordnet (Tascou et al., 2000).

Im folgenden wurde die immortalisierte Spermatozytenzelllinie GC-4spc mit der immortalisierten Spermatogonienzelllinie GC-1spg (Hofmann et al., 1992) auf der Ebene des Phänotyps und auf der Expressionsebene miteinander verglichen. Die GC-1spg Zellen zeigten im Vergleich zu GC-4spc Zellen ein erhöhtes invasives Potential, eine gesteigerte Proliferation sowie eine stärkere Expression des Tumormarkers GCAP bzw. seines Maus-homologen EAP. Die GC-1spg Zelllinie weist somit im Vergleich zur GC-4spc Zelllinie charakteristische Merkmale einer maligne transformierten Zelllinie auf (Tascou et al., 2001). Über die Methode der subtraktiven Hybridisierung wurden insgesamt 12 cDNA-Klone isoliert, die in GC-1spg Zellen differentiell überexprimiert sind und somit potentiell für den malignen Phänotyp der Zellen verantwortlich sind (Tascou et al., 2001). Unter den 12 differentiell exprimierten cDNA Klonen befinden sich 8 bekannte und 4 unbekannte cDNA-Klone, deren Sequenzen in der EST („expressed sequence tag“-)Datenbank erfasst sind. Von den 4 unbekanntem cDNA-Klonen, die in der GC-1spg Zelllinie differentiell exprimiert sind, wurde der Klon 45 weiterbearbeitet

und charakterisiert. Die cDNA-Sequenz wurde vervollständigt und auf Aminosäureebene zeigt sich eine Homologie zum „Ngg-1 interacting factor3“ der Hefe. Infolgedessen wurde die isolierte cDNA der Maus mit Nif311 („Ngg1-interacting factor 3 like-1“) und die isolierte humane cDNA-Sequenz analog mit NIF3L1 bezeichnet. Expressionsanalysen mit verschiedenen Zelllinien der Maus zeigten eine starke Überexpression des Nif311-Transkripts in der GC-1spg- und in der Teratokarzinom-Zelllinie F9. Expressionsanalysen an RNAs aus verschiedenen postnatalen und pränatalen Geweben der Maus ergaben eine ubiquitäre Expression in sämtlichen Geweben sowie eine Expression von Nif311 während der gesamten embryonalen Entwicklung. Das Nif311-Gen der Maus wurde auf Chromosom 1C lokalisiert. Das homologe humane NIF3L1-Gen konnte auf Chromosom 2q33 lokalisiert werden und besteht aus insgesamt sieben Exons, die ca. 14.5 kb genomische Sequenz umspannen. Mithilfe eines GFP-NIF3L1 Fusionsproteins wurde die zelluläre Lokalisation von NIF3L1 im Zytoplasma bestimmt (Tascou et al., 2000).

Mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid Screenings konnten aus einer HeLa cDNA-Bibliothek zwei Interaktionspartner von NIF3L1 isoliert werden. Die Interaktion der beiden Bindungspartner wurde im GST-Pulldown und im Mammalian-Two-Hybrid-System verifiziert. Bei den beiden Interaktionspartnern handelt es sich zum einen um eine Spleißvariante von NIF3L1, die für ein trunkiertes Protein von 350 Aminosäuren kodiert. Die Spleißvariante wurde als NIF3L1 $\alpha$ -1 bezeichnet. Der zweite Interaktionspartner repräsentiert ein unbekanntes Protein von 204 Aminosäuren, das als IF1 (Interacting Factor1) bezeichnet wurde. Das humane IF1-Gen wurde auf Chromosom 3p14.1 lokalisiert und besteht aus 8 Exons, die eine genomische Sequenz von ungefähr 30 kb umspannen. Weiterhin wurde die homologe If1 cDNA der Maus isoliert. Expressionsanalysen mit verschiedenen Geweben der Maus ergaben eine ubiquitäre Expression von If1. Mithilfe eines GFP-IF1 Fusionsproteins wurde die zelluläre Lokalisation von IF1 sowohl im Zytoplasma als auch im Kern bestimmt.

## **2. Experimenteller *in vivo* Ansatz**

Im Rahmen des experimentellen *in vivo* Ansatzes sollte das von Behringer et al. (1988) und Nayernia et al. (1998) erstmals beschriebene Konzept zur Analyse der Keimzellen zur malignen Transformation verwendet werden. Im transgenen Mausmodell sollte untersucht werden,

ob Spermatozyten bzw. Spermatogonien durch eine stadienspezifische Expression eines viralen Onkogens maligne transformiert werden können. Als virales Onkogen wurde das SV40 large T Antigen verwendet, das zur Familie der DNA-Tumorviren gehört und eines der am meisten verwendeten viralen Onkogene darstellt (Livingston et al., 1987).

### 2.1 PGK2-LTA transgene Mäuse

Um das LTA stadienspezifisch in den Spermatozyten zu exprimieren, wurde der humane PGK2-Promotor verwendet. Das PGK2-Gen kodiert für ein testisspezifisches Isoenzym, das bei Säugern keimzellspezifisch exprimiert wird. Unter anderem dient das PGK2-Gen zur Kompensation des X-chromosomal lokalisierten und während der Meiose inaktivierten PGK1-Gens (Hecht et al., 1998). Bei der Maus wird das P<sub>gk2</sub>-Gen ab dem 12. Tag in den Präleptotänspermatozyten exprimiert (McCarrey et al., 1992). Untersuchungen mit verschiedenen Keimzellfraktionen zeigten eine Expression des PGK2-Gens der Maus und des Menschen in sämtlichen Spermatozyten (Präleptotän bis Pachytän) sowie in runden Spermatiden (McCarrey et al., 1992, 1996). Desweiteren zeigten *in vivo* Promotorstudien, dass eine 1.4 kb große 5'-flankierende Sequenz des humanen PGK2-Gens in transgenen Mäusen transkriptionell aktiv ist und zu einer testisspezifischen Expression eines Reportergens führt (Robinson et al., 1989).

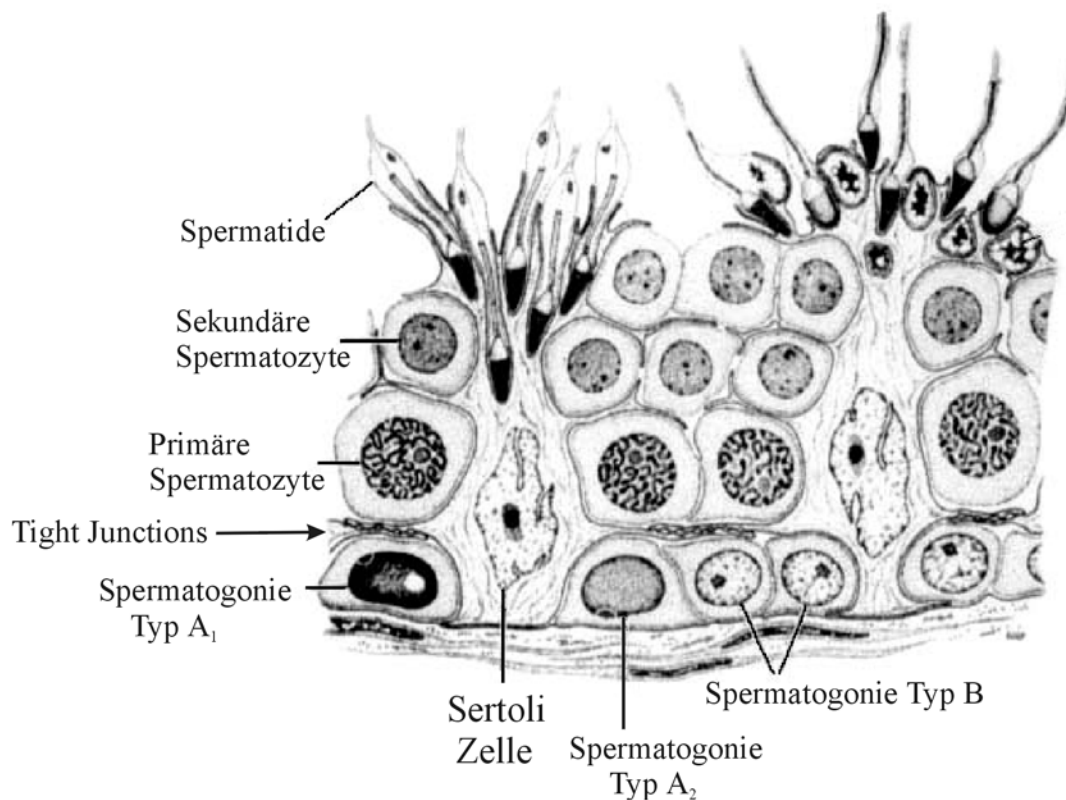
Die PGK2-LTA transgenen Mäuse waren fertil und zeigten äußerlich keine Abnormalitäten. Auch nach einer Periode von 20 Monaten konnten keine Anzeichen bezüglich einer Tumorentstehung im Testis oder in anderen Organen beobachtet werden. Diese Tatsache suggeriert, dass Spermatozyten keine Potenz zur malignen Transformation besitzen. Chaganti et al. (2000) postulierten das Stadium der Zygotän/Pachytänspermatozyten als Transformationsursprung der malignen Keimzelle beim Menschen. Begründet wurde diese Annahme durch die Koinzidenz folgender Eigenschaften des *Carcinoma in situ* (CIS) beim Menschen: das charakteristische Auftreten eines Isochromosoms auf 12p, die konsistente triploide-tetraploide Chromosomenanzahl sowie die relativ starke Expression von p53. Grundsätzlich zeigt das Stadium der Zygotän-/Pachytänspermatozyten ebenfalls eine relativ starke Expression von p53 (Schwartz et al., 1999), darüber hinaus soll es nach Chaganti et al. (2000) das wahrschein-

lichste Stadium sein, in dem die o.g. Merkmale des CIS aufgrund der charakteristischen Eigenschaften der Meiose am ehesten realisiert werden können. Die Tatsache jedoch, dass die PGK2-LTA transgenen Mäuse, die eine ektopische Expression des Transgens LTA ab dem Stadium der Präleptotänspermatozyten zeigen, keine Anzeichen einer malignen Transformation im Testis aufweisen, schwächt die o.g. Theorie ab und unterstützt die Theorie, dass testikuläre Keimzelltumoren von primordialen Keimzellen oder von Spermatogonien abstammen (Skakkebaek et al., 1987; Grigor et al., 1998). Transgene Mäuse, die das large T Antigen spezifisch in diesen Stadien exprimieren, könnten diesbezüglich weitere wichtige Erkenntnisse bringen.

Die während der Spermatogenese eintretende Angleichung der erhöhten Spermatozytenanzahl in den PGK2-LTA transgenen Mäusen an die Spermatozytenanzahl in den Wildtypmäusen, lässt sich aufgrund der Theorie der essentiellen numerischen Relation zwischen der Anzahl an Sertoli-Zellen und der Anzahl an Keimzellen erklären. Diese wird im folgenden näher beschrieben. Die Regulation der Proliferation und der Apoptose von Keimzellen im Testis ist ein empfindliches System, das von vielen Faktoren abhängt. Ein essentieller Faktor ist die sogenannte numerisch-äquilibrierte Keimzellen-Sertoli-Zellen Proportion. Während der gesamten Spermatogenese sind die Keimzellen von den Sertoli-Zellen umgeben. Diese sind unter anderem verantwortlich für die Versorgung der Keimzellen mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Überdies besitzen sie Adhäsions- und Transportfunktionen, die für die Differenzierung der Keimzellen von großer Bedeutung sind (Griswold et al., 1998). Das quantitative Verhältnis zwischen der Anzahl an Sertoli-Zellen und der Anzahl an Keimzellen bleibt während der gesamten Spermatogenese relativ konstant und ist von essentieller Bedeutung für die Homöostase der Keimzellentwicklung (Print et al., 2000; De Kretser et al., 1998). Dieses Phänomen konnte in verschiedenen Studien demonstriert werden. So geht beispielsweise ein künstlich erzeugter Hypothyroidismus in den ersten 30 Tagen der testikulären Entwicklung der Ratte mit einer erhöhten Zahl von Sertoli-Zellen einher, die gleichzeitig auch mit einer erhöhten Zahl an Keimzellen verbunden ist (Van Haaster et al., 1992). Im Gegensatz dazu führt ein künstlich erzeugter Hyperthyroidismus bei der Ratte zu einer Verminderung der Zahl der Sertoli-Zellen, die zugleich mit einer Verminderung der Anzahl der Keimzellen korreliert (Cooke et al., 1994). In einer anderen Studie zeigte eine experimentelle Reduktion der Sertoli-Zellen von Ratten im präpubertären Alter durch die Zugabe eines Toxins eine deutliche Verminderung der elongierenden Spermatozyten im adulten Tier (Orth et al., 1998). Die einset-

zende apoptotische Regulierung in den präpubertären transgenen PGK2-LTA Mäusen hält somit die Keimzell-Homöostase aufrecht und reflektiert die Angleichung an das essentielle numerische Gleichgewicht zwischen den Sertoli-Zellen und den Keimzellen.

Während der Spermatogenese entwickeln sich Spermatozyten aus den Spermatogonien des Typs B, somit besteht zwischen beiden Keimzelltypen ein quantitativer Zusammenhang. Obwohl das Transgen LTA erst ab dem 12. Tag der testikulären Entwicklung im Stadium der Präleptotänspermatozyten detektiert wurde, muss dennoch das Stadium der Spermatogonien als Ausgangsstadium für die Proliferationserhöhung in Betracht gezogen werden. Für die erhöhte Anzahl an Spermatozyten in den PGK2-LTA transgenen Mäusen kommt somit entweder eine gleichzeitig erhöhte Anzahl an Spermatogonien des Typs B oder eine erniedrigte Apoptoserate der Spermatogonien in Betracht. Eine erhöhte Anzahl an Keimzellen, die durch eine gesteigerte Anzahl an Sertoli-Zellen verursacht wird, kann ausgeschlossen werden, da die Anzahl der Sertoli-Zellen in den PGK2-LTA transgenen Mäusen keinen Unterschied zu den Wildtypmäusen zeigte. Ein Einfluss der Spermatogonien auf die erhöhte Zellproliferation lässt sich molekular entweder aufgrund einer sehr schwachen Expression des Transgens LTA in den Spermatogonien erklären, die mit den verwendeten Methoden nicht detektierbar ist, oder aufgrund einer sogenannten „Feed-Back“-Signalübermittlung zwischen Spermatozyten und Spermatogonien erklären. Im letzteren Fall handelt es sich um eine indirekte Signalübermittlung über Sertoli-Zellen, da Spermatogonien und Spermatozyten strukturell in den Tubuli seminiferi durch sogenannte „Tight Junctions“ voneinander getrennt sind (Russel et al., 1990) (Abb. 52).



**Abb. 52** Strukturelle Darstellung eines Tubulus seminiferus. Die Sertoli-Zellen sind mit sämtlichen Keimzellstadien verbunden. Spermatogonien und Spermatozyten sind durch „Tight Junctions“ voneinander getrennt.

Eine direkte Interaktion zwischen Spermatozyten und Sertoli-Zellen konnte bereits *in vitro* in der Studie von Djakiew et al. (1998) gezeigt werden. Dabei stimulierten in einer Kokultur Spermatozyten die Sertoli-Zellen zur Abgabe sekretorischer Proteine (Djakiew et al., 1998). In diesem Zusammenhang wäre eine Erklärung für die erhöhte Zellproliferation der Spermatozyten in den transgenen Mäusen die, dass die LTA-Expression die Keimzell-Sertoli-Zell-Interaktion beeinflusst. Dadurch könnten beispielsweise die Spermatozyten die Sertoli-Zellen stimulieren, so dass diese wiederum Einfluss auf die Spermatogonien-Proliferation nehmen können. Die Sertoli-Zellen könnten eine Stimulation zur Proliferation der Spermatogonien oder eine verminderte Stimulation zur Apoptose der Spermatogonien induzieren. Über derartige Keimzell-Sertoli-Zell Interaktionen, die spezielle Eigenschaften von Sertoli-Zellen variieren, wurde bereits in einer Vielzahl wissenschaftlicher Publikationen berichtet. Eine verminderte Expression des Calgizzarin-Gens wurde in einer Kokultur aus Keimzellen und Sertoli-Zellen demonstriert. Dagegen konnte in einer Primärkultur aus Sertoli-Zellen eine deutlich

stärkere Expression des Calgizzarin-Gens festgestellt werden (Kraszucka et al., 1999). In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass die spezifische Expression von Interleukin-1 (IL-1) in Sertoli-Zellen auf einer Interaktion mit Keimzellen beruht (Jonsson et al., 1999). Fujisawa et al. (2000) zeigten, dass Spermatozoen in einer Kokultur mit Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen die Synthese von Stickstoffoxid (NO) sowie die Expression der Stickstoffoxid-Synthase (iNOS) induzieren.

Die Befunde bei den PGK2-LTA transgenen Mäusen demonstrieren erneut die Fähigkeit viraler Onkogene, gleichzeitig Proliferation und Apoptose zu induzieren (Blagosklonny et al., 1999). In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass humane Epithelzellen, die mit dem SV40 large T Antigen immortalisiert wurden, in der Lage waren, Apoptose über einen p53-unabhängigen Signalweg zu induzieren (Tsao et al., 1998). Außerdem zeigten transgene Mäuse, die hepatozelluläre Karzinome aufgrund einer Expression des SV40 large T Antigens in den Hepatozyten unter der Kontrolle eines Antithrombin III-Promotors entwickelten, eine Äquilibration der erhöhten Proliferation der Hepatozyten mittels Apoptose (Allemand et al., 1995). Derselbe Effekt wurde in transgenen Mäusen beobachtet, die das HBx-Protein des Hepatitis B Virus exprimierten (Koike et al., 1998). Wie die molekularen Mechanismen des Zusammenspiels zwischen Apoptose und Proliferation im Detail funktionieren, ist bislang unklar.

Eine Induktion der Zellproliferation durch das large T Antigen beruht unter anderem auf der Bindung und Inaktivierung der Retinoblastomfamiliemitglieder Rb, p107 und p130 über die N-terminale Domäne (Aminosäureposition 105-115) des SV40 large T Antigens (De Caprio et al., 1988) (Abb. 53). Dadurch greift das LTA direkt in die Mechanismen der Zellzyklusregulation ein, wodurch die Zelle induziert wird, in die S-Phase einzutreten (Ewen et al., 1991). Über zwei weitere Domänen (Aminosäureposition 350-450, 532-625) bindet und inaktiviert das large T Antigen das Tumorsuppressorprotein p53 (De Caprio et al., 1988) (Abb. 53). p53 besitzt zahlreiche zelluläre Funktionen, unter anderem wirkt es als ein Transkriptionsaktivator von proapoptotischen Genen und sogenannten Wachstums-Inhibitorgenen. Durch die Bindung mit dem large T Antigen werden diese Funktionen von p53 inhibiert, wodurch es zu einer abnormen Proliferation der Zellen kommen kann (Bates et al., 1999).

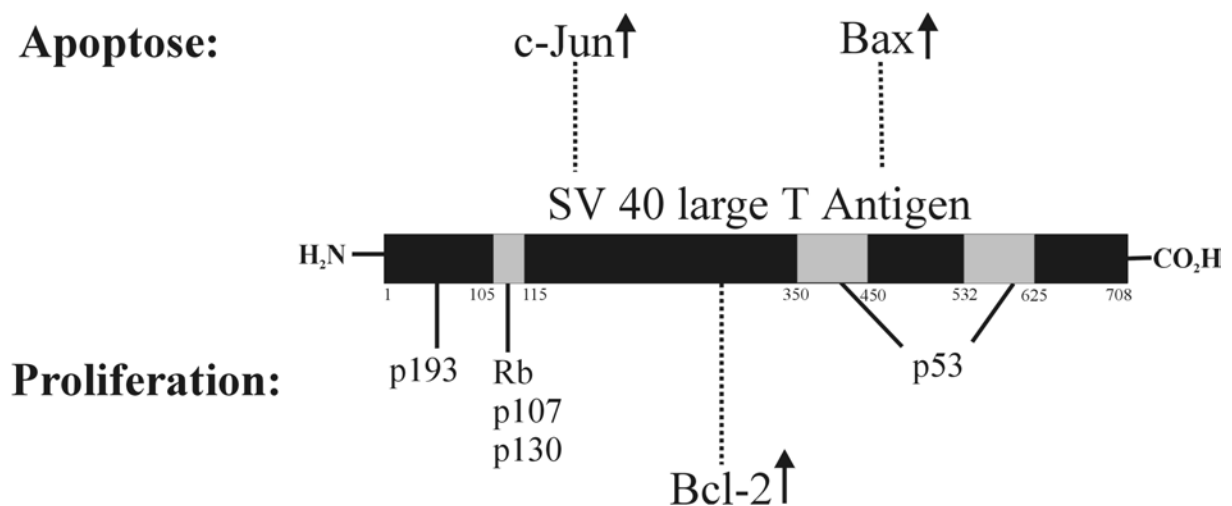


Die Induktion von Apoptose durch das SV40 large T Antigen wird grundsätzlich über einen p53-unabhängigen Signalweg vermutet (Tsao et al., 1998). So konnten Chen et al. (1998) zeigen, dass immortalisierte humane Epithelzellen, die mit dem large T Antigen stabil transfiziert wurden, Apoptose induzierten, die mit einer Überexpression des Transkriptionsfaktors c-Jun assoziiert war. Eine gezielte Überexpression von c-Jun in humanen Epithelzellen führte ebenfalls zur Apoptose. Es wird daher angenommen, dass der Transkriptionsfaktor c-Jun proapoptotische Gene aktiviert und somit eine funktionelle Relevanz bei der large T Antigen induzierten Apoptose besitzt (Chen et al., 1998) (Abb. 53).

Eine weitere Möglichkeit, wie die molekularen Mechanismen der LTA induzierten Proliferation und Apoptose in den PGK2-LTA transgenen Mäusen funktionieren könnten, wäre im Zusammenspiel von LTA mit den Proteinen der Bcl-2 Familie denkbar. Einige Mitglieder der Bcl-2 Familie wie z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 und A1 wirken anti-apoptotisch, wohingegen andere Mitglieder der Familie wie z.B. Bax, Bak und Bim pro-apoptotisch wirken (Print et al., 2000). Die konkurrierenden Interaktionen der Pro- und Antiapoptoseproteine der Bcl-2 Familie im Testis sind von essentieller Bedeutung für einen störungsfreien Ablauf der Spermatogenese und für die Aufrechterhaltung der Keimzellhomöostase (Print et al., 2000). Dies konnte vor allem in der Studie von Rodriguez et al. (1997) gezeigt werden, in der transgene Mäuse, die Bcl-x<sub>L</sub> oder Bcl-2 überexprimierten, im adulten Alter eine defekte Spermatogenese aufwiesen. Durch die starke Überexpression der antiapoptotischen Proteine Bclx<sub>L</sub> und Bcl-2 kam es zu einer Prävention der ersten Apoptosewelle im Testis, die in Wildtypmäusen gewöhnlich zwischen dem 8. und dem 10. Tag eintritt (Print et al., 2000). Dadurch wurde das numerische Verhältnis zwischen den Sertoli-Zellen und den vorhandenen Keimzellen empfindlich gestört (Rodriguez et al., 1997).

In anderen Publikationen konnten direkte Zusammenhänge zwischen dem SV40 large T Antigen und Mitgliedern der Bcl-2-Familie gezeigt werden. Diese werden im folgenden beschrieben. Naik et al. (1996) zeigten, dass transgene Mäuse, die das large T Antigen unter der Kontrolle des Metallothionin-Promotors exprimierten, Pankreastumoren ausbildeten. Eine Überexpression des Bcl-2-Gens konnte in den Tumoren festgestellt werden (Abb. 53). C3(1)/SV40LTA transgene Mäuse, von denen vorher gezeigt worden war, dass sie charakteristische Mammakarzinome ausbilden, zeigten eine erhöhte Apoptose im präneoplastischen Zustand, die mit einer erhöhten Bax-Expression assoziiert war (Shibata et al., 1999) (Abb. 53).

Außerdem zeigten Kreuzungen von Bax (-/-) knockout-Mäusen mit C3(1)/SV40LTA transgenen Mäusen eine beschleunigte Tumorgenese sowie eine Reduktion der Apoptose im präneoplastischen Zustand (Shibata et al., 1999). Eine molekulare Interaktion zwischen dem SV40 large T Antigen und einem Mitglied der Bcl-2 Familie konnte für p193, einem Protein mit einer Bcl-2 homologen Domäne, nachgewiesen werden (Abb. 53). Eine Überexpression von p193 in NIH3T3 Fibroblastenzellen führte zu einer erhöhten Apoptoserate (Tsai et al., 2000). Expressionsanalysen mit RNAs aus verschiedenen Geweben der Maus zeigten darüber hinaus eine relativ starke Expression von p193 im Herzen und im Testis. Die hier aufgeführten Beispiele deuten insgesamt auf ein wichtiges Zusammenspiel zwischen dem SV40 LTA und den Proteinen der Bcl-2-Familie hin.



**Abb. 53** Schematische Darstellung des SV40 large T Antigens im Zusammenspiel zwischen Apoptose und Proliferation. Dargestellt sind die Bindungdomänen, über die das LTA die Mitglieder der Retinoblastomfamilie Rb, p107, p130 sowie das Tumorsuppressorprotein p53 bindet. Dadurch inhibiert es die Aktivitäten dieser Proteine, wodurch es unter anderem zu einer erhöhten Zellproliferation kommen kann. Darüber hinaus bindet und inhibiert das LTA im N-Terminus das Bcl-2-homologe Protein p193, das proapoptotische Funktionen aufweist. In der Studie von Naik et al. (1996) wurde gezeigt, dass die LTA induzierte Proliferation mit einer Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins assoziiert ist. Im Zusammenhang mit einer LTA induzierten Apoptose konnte gezeigt werden, dass dies mit einer Überexpression des Transkriptionsfaktors c-Jun (Chen et al., 1998) sowie mit einer Überexpression des proapoptotischen Proteins Bax (Shibata et al., 1999) assoziiert ist.

Verglichen mit den Ergebnissen früherer Studien, in denen das LTA in transgenen Mäusen unter der Kontrolle eines Protamin 1- bzw. Proakrosin-Promotors spezifisch in den Spermati-

den exprimiert wurde (Behringer et al., 1988; Nayernia et al., 1998) und unter Berücksichtigung der Befunde in den PGK2-LTA transgenen Mäusen, lässt sich schlussfolgern, dass weder Spermatiden noch Spermatozyten die Suszeptibilität zur malignen Transformation besitzen. Die PGK2-LTA transgenen Mäuse demonstrieren jedoch eindrucksvoll das empfindliche Zusammenspiel zwischen Proliferation und Apoptose der Keimzellen zur Aufrechterhaltung der Keimzellhomöostase.

### 2.2 TSPY-LTA transgene Mäuse

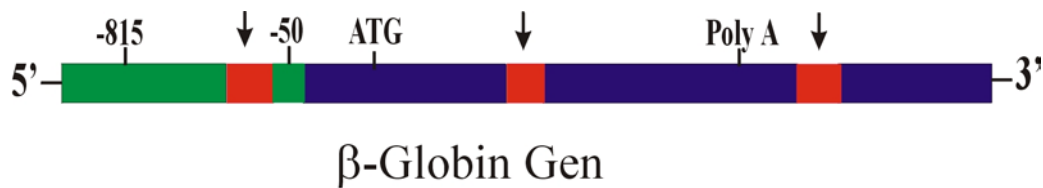
Um das LTA stadienspezifisch in den Spermatogonien zu exprimieren, wurde der humane TSPY (testis-specific protein, Y-encoded)-Promotor verwendet. Das TSPY-Gen ist beim Menschen auf dem Y-Chromosom lokalisiert und liegt in ca. 30-40 Kopien vor. Eine Expression konnte beim Menschen ausschließlich im Testis detektiert werden (Arnemann et al., 1991). Antikörperfärbungen an Testisschnitten zeigten eine spezifische Expression von TSPY in Spermatogonien und vereinzelt auch in Spermatozyten (Schnieders et al., 1996). Darüber hinaus wurde auch eine erhöhte Expression von TSPY im *Carcinoma in situ* festgestellt (Schnieders et al., 1996). Bei der Maus liegt das Tspy-Gen als „single copy“-Gen vor und besitzt zahlreiche „in-frame“-Stopkodons innerhalb der kodierenden Sequenz, so dass es sich hierbei um ein transkribiertes Pseudogen handeln sollte (Mazeyrat et al., 1998). Die transkriptionelle Aktivität der hier verwendeten 1.3 kb langen 5'-flankierenden Sequenz des humanen TSPY-Gens wurde zunächst unter Verwendung eines CAT-Reportergens in der GC-1spg Zelllinie überprüft (III. 4.5). Insgesamt konnten zwei transgene Mauslinien etabliert werden, die das LTA im Testis exprimieren (Linie 23 und 61). Bei der Linie 23 konnte außerdem eine Expression des LTA in der Milz detektiert werden. Demnach wird das LTA in den TSPY-LTA transgenen Mäusen nicht testisspezifisch exprimiert.

Bei den TSPY-LTA transgenen Mäusen traten in der Linie 23 und beim Founder Nr. 57 Tumoren in der Sella turcica auf. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Hypophysentumoren. Der Testis und andere Gewebe sind pathologisch unauffällig. Die Tumoren werden derzeit in Zusammenarbeit mit Dr. Schulz-Schaeffer, Abt. Neuropathologie, Universitätsklinikum Göttingen, untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass die Tumoren in zwei unabhängigen

Linien und in mehreren transgenen Tieren aufgetreten sind, lassen sich ein Positionseffekt des Transgens oder die Entstehung spontaner Tumoren ausschließen.

Das hier beobachtete Phänomen transgener Mäuse, die das SV40 large T Antigen unter der Kontrolle eines testisspezifischen Promotors exprimieren und Tumoren außerhalb des Testis entwickeln, wurde erstmals in der Studie von Behringer et al. (1988) beschrieben. Dabei entwickelten transgene Mäuse, die das LTA unter der Kontrolle des testisspezifischen Protamin 1-Promotors exprimierten, Tumoren im Herzen und im Knochenmark. Als Transgen wurde in der o.g. Studie das LTA unter der Kontrolle einer 5 kb langen 5'-flankierenden Sequenz und einer 465 bp langen 3'-flankierenden Sequenz des Protamin 1-Gens der Maus verwendet. Eine Expression des Transgens LTA konnte in der Studie von Behringer et al. (1988) erwartungsgemäß in den runden Spermatisden detektiert werden, erstaunlicherweise zeigte sich aber auch eine Expression im Herzen und im Knochenmark. Diese ektopische Expression führte in den transgenen Mäusen zur Bildung von Rhabdomyosarcomen im rechten Atrium und bilateralen Osteosarcomen. Eine endogene Expression des Protamin 1-Gens der Maus konnte weder im Herzen noch im Knochenmark gefunden werden (Behringer et al., 1988). Die ektopische Expression des LTA in den transgenen Mäusen war somit eine direkte Konsequenz der juxtapositionierten 5'-flankierenden Sequenz des Protamin 1-Gens an das LTA, wodurch vermutlich neue regulatorische Elemente entstanden sind, die für die ektopische Expression des LTA verantwortlich sind (Behringer et al., 1988).

Obwohl cis-aktive Elemente, die eine gewebespezifische Expression eines Gens regulieren, gewöhnlich in der 5'-flankierenden Sequenz des jeweiligen Gens lokalisiert sind, können diese auch innerhalb der Gensequenz, z.B. in Introns oder in der 3'-flankierenden Region des jeweiligen Gens lokalisiert sein. Diese Situation ist beispielsweise für das  $\beta$ -Globin-Gen bekannt (Behringer et al., 1987) (Abb. 54).



**Abb. 54** Schematische Darstellung des  $\beta$ -Globin Gens und seiner regulatorischen Elemente in den 3'-flankierenden Sequenzen. Für eine spezifische Expression des  $\beta$ -Globin Gens in unreifen Erythrozyten sind drei regulatorische Elemente essentiell, diese sind in roten Boxen und mit einem Pfeil gekennzeichnet. Ein regulatorisches Element befindet sich in der 5'-flankierenden Sequenz, ein weiteres, essentielles regulatorisches Element befindet sich im Exon III und das dritte regulatorische Element befindet sich 250 bp nach dem Poly (A)-Signal in der 3'-flankierenden Sequenz (Behringer et al., 1987).

Bei der Konstruktion chimärer Gene, wie z.B. bei Transgenkonstrukten, kann es somit zu unerwarteten Expressionsmustern kommen. Dieses Phänomen wurde bereits bei verschiedenen chimären Genen in transgenen Mäusen beobachtet. So zeigten beispielsweise transgene Mäuse, die das LTA unter der Kontrolle des humanen GRF („growth hormone releasing factors“-) Promotors fusioniert hatten, eine unerwartete Expression des Transgens LTA im Thymus, wodurch es dort zur Bildung von Tumoren kam (Botteri et al., 1987). In ähnlicher Weise wurde das Wachstumshormon-Gen, das unter der Kontrolle des Metallothionin-Promotors stand, in neuronalem Gewebe transgener Mäuse exprimiert, obwohl weder das Methallothionin-Protein noch das Wachstumshormon-Protein in neuronalen Zellen der Wildtypmaus nachweisbar sind (Swanson et al., 1985).

Eine ähnliche Situation ist bei den TSPY-LTA transgenen Mäusen vorstellbar. Die Tatsache, dass eine Expression des LTA in der Milz detektiert wurde, lässt vermuten, dass das Transgen LTA auch in anderen Organen ektopisch exprimiert wird und dort die Bildung von Tumoren induziert. Die Charakterisierung und Analyse der transgenen TSPY-LTA Mäuse ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

### 3. Experimenteller *in vitro* Ansatz

In dem *in vitro* Ansatz sollte die Potenz der Spermatogonien und Spermatozyten zur malignen Transformation unter Verwendung spezifischer immortalisierter Keimzellkulturen evaluiert werden. Zunächst sollte eine neue immortalisierte Spermatozytenzelllinie GC-4spc mit Hilfe des Promotor-basierten Selektionsverfahrens generiert werden. Anschließend sollte die Spermatogonienzelllinie GC-1spg (Hofmann et al., 1992) mit der neuen Spermatozytenzelllinie GC-4spc (Tascou et al., 2000) auf der Ebene des Phänotyps sowie auf der Expressionsebene miteinander verglichen werden. Die Spermatogonienzelllinie GC-1spg ist mit dem SV40 large T Antigen immortalisiert worden. Sie repräsentiert ein Differenzierungsstadium zwischen den Spermatogonien des Typs B und den Präleptotänspermatozyten (Hofmann et al., 1992).

#### 3.1 Etablierung einer Spermatozytenzelllinie GC-4spc

Die konventionelle Methode zur Herstellung permanenter Zelllinien basiert darauf, sämtliche isolierten Zellen mit einem viralen Onkogen unter der Kontrolle eines ubiquitär-aktiven Promotors zu transfizieren. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch eine geringere Spezifität des Zelltyps, da bei der Isolierung bestimmter Zellen aus einem Organismus grundsätzlich Kontaminationen mit anderen Zelltypen auftreten, die dann infolge der Transfektion ebenfalls immortalisiert werden. Die neue permanente Spermatozytenzelllinie GC-4spc der Maus wurde mit Hilfe des Promotor-basierten Selektionsverfahrens hergestellt. Hierbei kommt es neben der konventionellen Immortalisierung auch zu einer spezifischen Selektion aufgrund eines zusätzlich transfizierten Resistenzgens, das unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors steht. Bei der GC-4spc Zelllinie handelte es sich um den testisspezifischen Promotor des humanen PGK2-Gens unter dessen Kontrolle das Resistenzgen (Neomycin) exprimiert wird. Das Expressionsmuster des PGK2-Gens wurde in Abschnitt (IV.2.1) beschrieben. Die durchgeführten Expressionsanalysen zeigten, dass die GC-4spc Zelllinie einem Differenzierungsstadium zwischen den Präleptotänspermatozyten und den frühen Pachytänspermatozyten entspricht.

Auffällig in diesem Zusammenhang ist, dass bei den RT-PCR-Analysen für A-myb und Proakrosin die Transkripte nur unter Verwendung von isolierter GC-4spc Poly A<sup>+</sup>-RNA nachweisbar waren. Die Amplifikation der jeweiligen Positivkontrolle erfolgte hingegen über testikuläre Gesamt-RNA (III. 4.4). Eine ähnliche Situation wurde bereits von der GC-2spd – Zelllinie berichtet. Diese Zelllinie wurde von Hofmann et al. (1994) hergestellt und repräsentiert ein Differenzierungsstadium der Spermatozyten. In dieser Zelllinie konnte keine Expression typischer Markergene wie z.B. LDH-C4 (Präleptotänspermatozyten), Akrosin (Pachytänspermatozyten), SP-10 (runde Spermatozyten) oder Protamin 2 (runde Spermatozyten) detektiert werden (Wolkowicz et al., 1996). Neuere Studien konnten jedoch eine Expression der testisspezifischen CREB Spleißvariante (Sanborn et al., 1997) und verschiedener mitochondrialer Differenzierungsmarker wie hsp60, SOx oder COx-IV in der GC-2spd Zelllinie demonstrieren (Meinhardt et al., 1997). Eine Erklärung für die verminderte Expression spezifischer Keimzellmarker in der GC-2spd- und in der GC-4spc Zelllinie könnte eine fehlende oder verminderte Keimzell-Sertoli-Zell-Interaktion sein.

Im Testis sind sämtliche Keimzellen in engem Kontakt mit den Sertoli-Zellen (Griswold et al., 1998). Diese sind unter anderem verantwortlich für die Versorgung der Keimzellen mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Darüber hinaus besitzen sie Adhäsions- und Transportfunktionen, die für die Differenzierung der Keimzellen von großer Bedeutung sind (Griswold et al., 1998). Verschiedene *in vitro* Studien konnten einen direkten Einfluss der Sertoli-Zellen auf die Genexpression in den Keimzellen demonstrieren. So konnte in der Studie von Tsuruta et al. (1995) gezeigt werden, dass in einer Kokultur die Expression des „Insulin-like Growth factor II“ in den Sertoli-Zellen die Expression von c-fos in Keimzellen beeinflusst. In einer kürzlich publizierten Studie konnte demonstriert werden, dass THEG (testicular haploid expressed gene) in Spermatozyten nur in einer Kokultur mit Sertoli-Zellen exprimiert wird. In kultivierten Spermatozyten wird die Expression von THEG merklich herunterreguliert (Nayernia et al., 1999). Diese Studien belegen den Einfluss der Sertoli-Zellen auf die Genexpression in den Keimzellen *in vitro*. Eine angelegte Kokultur aus Sertoli-Zellen und der GC-4spc Zelllinie könnte diesbezüglich weitere Erkenntnisse bringen, ob eine Genexpression in den GC-4spc Zellen verstärkt wird.

Ein kritischer Punkt bleibt die Tatsache, dass, obwohl das PGK2-Gen sowohl bei der Maus als auch beim Menschen vom Differenzierungsstadium der Präleptotänspermatozyten bis hin

zu den runden Spermatiden exprimiert wird (McCarrey et al., 1992), bei der Herstellung der GC-4spc Zelllinie ausschließlich Spermatozyten immortalisiert wurden. Chromosomale Analysen zeigten eindeutig, dass die GC-4spc Zellen ein diploides Genom besitzen und somit *in vitro* nicht weiter in haploide Spermatiden differenzieren. Sämtliche in der Literatur beschriebenen Versuche, etablierte Keimzelllinien wie die Spermatogonienzelllinie GC-1spg oder die Spermatidenzelllinie GC-2spd über eine Kokultivierung mit Sertoli-Zellen oder über die Zugabe von Hormonen wie Retinsäure und Testosteron zu einer Differenzierung *in vitro* anzuregen, schlugen bisher fehl (Hofmann et al., 1992; Wolkowicz et al., 1996). Nayernia et al. (1998) postulierte die Hypothese, dass postmeiotische Keimzellen weder die Potenz zur Immortalisierung noch die Potenz zur Transformation besitzen. Begründet wurde dies mit der Tatsache, dass im fortgeschrittenem Differenzierungsstadium der haploiden Spermatiden der allgemeine Transkriptionsprozess von Genen terminiert wird (Hecht et al., 1998). Davon könnten auch Gene betroffen sein, die für eine Transformation und Immortalisierung postmeiotischer Keimzellen essentiell sind.

Eine weitere Hypothese ist, dass die Expression des LTA eine kontinuierliche Differenzierung in haploide Keimzellen direkt verhindert. Eine Möglichkeit, dies zu untersuchen, besteht darin, die GC-4spc Zellen mit der Temperatur-sensitiven LTA Variante SV40tsA58 (Okuyama et al., 1995), die nur bei 37°C aktiv ist, zu transfizieren. Somit könnte nach der Immortalisierung der Zellen die LTA-Funktion vorübergehend bei 32°C inaktiviert werden, so dass die Zellen *in vitro* differenzieren könnten.

Mit Hilfe der Promotor-basierten Selektionsmethode wurde erstmals eine spezifische Spermatozytenzelllinie GC-4spc etabliert. Diese gilt als Prototyp für andere Zelllinien, da die Promotor-basierte Selektionsmethode die Generierung einer Vielzahl spezifischer Zelllinien erlaubt, die sehr spezielle Entwicklungsstadien in Geweben repräsentieren können. Durch die Promotor-basierte Selektionsmethode besteht auch die Möglichkeit, transient vorkommende Entwicklungsstadien von Geweben oder Zelltypen aus einem Organismus als stabile Zelllinien herzustellen. Die Verwendung eines Resistenzgens, das unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors exprimiert wird, erlaubt die Etablierung hochspezifischer Zelllinien.



### **3.2 Vergleich der GC-1spg Zelllinie mit der GC-4spc Zelllinie auf der Ebene des Phänotyps und auf der Ebene der Expression**

Der Vergleich der GC-1spg Zelllinie mit der GC-4 Zelllinie auf der Ebene des Phänotyps hat gezeigt, dass die GC-1spg Zelllinie im Vergleich zur GC-4spc Zelllinie deutlich stärker proliferiert und ein erhöhtes invasives Potential aufweist (Tascou et al., 2001) (Tab. 6). Für einen Vergleich auf der Ebene der Expression wurde zunächst eine Expressionsanalyse des humanen GCAP (germ cell alkaline phosphatase)-Gens bzw. seines Maus-homologen EAP (embryonic alkaline phosphatase)-Gens in beiden Zelllinien durchgeführt. Das humane GCAP-Gen wird normalerweise während der Embryogenese in den primordialen Keimzellen sowie in geringerer Menge postnatal im Testis und im Thymus exprimiert (Hofmann et al., 1993). Außerdem wird das GCAP-Gen als Tumormarker für Seminome und für das *Carcinoma in situ* verwendet, da es in diesen Geweben stark überexprimiert ist (Hofmann et al., 1989). Aufgrund dieser ektopischen Expression des GCAP wird es als onkofötales Protein klassifiziert. Das äquivalente Maus-Isoenzym EAP wird vorwiegend zwischen dem 2- bis 8-Zell-Stadium während der Embryogenese exprimiert. Eine Expression nach dem Blastozystenstadium konnte nicht nachgewiesen werden. Anschließend folgt eine Wiederkehr der Expression von EAP in Testis, Darm und Thymus der adulten Maus (Narisawa et al., 1992). Insgesamt ist das Expressionsmuster des Maus-homologen EAP mit dem humanen GCAP vergleichbar. Aus diesem Grund werden auch gleiche Funktionen von EAP und GCAP im Testis vermutet (Narisawa et al., 1992). Während der Spermatogenese der Maus konnte nur in Spermatozyten, die sich in der sogenannten M-Phase der Meiose befinden, eine Expression von EAP detektiert werden (Narisawa et al., 1992). Über eine semiquantitative RT-PCR konnte eine verstärkte Expression von EAP in der GC-1spg Zelllinie beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten Promotorstudien eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität einer 1.6 kb langen 5'-flankierenden Sequenz des humanen GCAP-Gens in der GC-1spg Zelllinie im Vergleich zur GC-4 Zelllinie. Die deutlich erhöhte Invasivität sowie die gesteigerte Expression des Tumormarkers GCAP bzw. seines Maus-homologen EAP deuten darauf hin, dass es sich bei der GC-1spg Zelllinie um eine maligne transformierte Zelllinie handelt (Tascou et al., 2001) (Tab. 6).

<b>Eigenschaften</b>	<b>Spermatogonienzelllinie GC-1spg</b>	<b>Spermatozytenzelllinie GC-4spc</b>
Referenz	Hofmann et al. (1992)	Tascou et al. (2000)
Herstellung	Immortalisierung mit dem SV40 large T Antigen	Promotor-basierte Selektionsmethode, Immortalisierung mit dem SV40 large T Antigen
DNA-Gehalt	diploid	diploid
Expression spezifischer Markergene	LdhX, Cytochrom C	Pgk2, Akrosin, A-myb
Differenzierungsstadium	Spermatogonien Typ B bis Präleptotänspermatozyten	Präleptotän- bis frühe Pachytänspermatozyten
Expression GCAP bzw. EAP	relativ zu GC-4spc erhöht	relativ zu GC-1spg erniedrigt
Proliferation	relativ zu GC-4spc erhöht	relativ zu GC-1spg erniedrigt
Invasivität	relativ zu GC-4spc erhöht	relativ zu GC-1spg erniedrigt

**Tab. 6** Darstellung der verschiedenen Eigenschaften der Spermatogonienzelllinie GC-1spg (Hofmann et al., 1992) und der Spermatozytenzelllinie GC-4spc (Tascou et al., 2000).

Um Gene zu isolieren, die in der GC-1spg Zelllinie differentiell exprimiert werden, und damit potentiell für den malignen Phänotyp der Zelllinie verantwortlich sind, wurde die Methode der subtraktiven Hybridisierung angewandt. Dabei wurden insgesamt über 120 cDNA-Klone isoliert und sequenziert. Northern Blot-Analysen zeigten anschließend, dass 8 bekannte- und 4 unbekannte Gene in GC-1spg Zellen überexprimiert sind. Die cDNA-Klone wurden als bekannt definiert, wenn mindestens eine vollständige cDNA-Sequenz der Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus* oder *Rattus norvegicus* in den öffentlichen Datenbanken registriert ist. Als unbekannt wurden die cDNA-Klone definiert, deren cDNA-Sequenzen nur in den EST (expressed sequence tag)-Datenbanken registriert sind. Unter den 8 bekannten Genen, die in den GC-1spg Zellen überexprimiert sind, befinden sich die Gene für L6 Antigen, Integrin alpha6, Annexin VIII, Protektives Protein, Retrotransposon BVL-1, Alpha-Catenin, LPS-Bindungsprotein und Histon H3.3. Die differentiell exprimierten Gene gelten als Kandidatengene, die im malignen Transformationsprozess der GC-1spg Zelllinie involviert sein können. Für einige der bekannten Gene wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass sie im Prozess der Tumorgenese und Invasivität involviert sind (Tab. 7).

In diesem Zusammenhang kommt dem Integrin alpha6 eine besondere Relevanz zu. So korreliert eine verminderte Lebenserwartung von Patienten mit invasivem Brustkrebs oder hepatozellulären Karzinomen mit einer Überexpression von Integrin alpha6 in den entsprechenden Tumoren (Wewer et al., 1997; Begum et al., 1995). Studien mit Prostatakarzinom-Zellen zeigten eine verminderte Expression sämtlicher Integrinfamilienmitglieder, außer Integrin alpha6, das deutlich überexprimiert wird. Nach einer peritonealen Injektion dieser Prostatakarzinom-Zellen in SCID-Mäuse konnte ein stark invasives Tumorwachstum registriert werden. Eine peritoneale Injektion der Prostatakarzinom-Zellen, die vorher mit einem Anti-Integrin alpha6 Antikörper behandelt worden waren, führte zu einem stark verminderten invasiven Tumorwachstum (Rabinovitz et al., 1995). Darüber hinaus wurde eine Überexpression von Integrin alpha6 in intratubulären Keimzellneoplasien sowie in primären und metastasierenden Seminomen des Menschen festgestellt (Timmer et al., 1994).

Das L6 Antigen gehört zu einer Familie integraler Membranproteine, zu der auch CD63 und CO-029 gehören. Es wird in verschiedenen Karzinomen wie Lungen-, Brust-, Dickdarm- und Ovarialkarzinomen überexprimiert (Marken et al., 1992). Ein monoklonaler Anti-L6 Antikörper der Maus war durch eine Antikörper-abhängige zelluläre Toxizität in der Lage, das Wachstum von humanen Adenokarzinom-, Colonkarzinom-, Lungenkarzinom- sowie Melanomzelllinien zu unterbinden (Hellstrom et al., 1986). Desweiteren konnte das Wachstum eines transplantierten humanen Lungentumors in Nacktmäusen durch die Zugabe eines monoklonalen Anti-L6 Antikörpers vermindert werden (Hellstrom et al., 1986).

Annexin VIII, dessen Expression sehr stark in den GC-1spg Zellen hochreguliert ist, besitzt eine Funktion als Antigerinnungs-Protein im Blut (Sarkar et al., 1994). Annexin VIII wird sehr stark in den Zellen bei akuter promyeloischer Leukämie überexprimiert, wohingegen Northern Blot-Analysen mit RNAs verschiedener humaner Gewebe eine Expression von Annexin VIII nur in der Plazenta und in der Lunge detektierten (Chang et al., 1992). Immunfluoreszenzfärbungen lokalisierten das Protein auf der Plasmamembran. Die physiologische Funktion von Annexin VIII ist unklar. Jedoch konnte man zeigen, dass Annexin VIII innerhalb der zellulären Signaltransduktion die Protein Kinase C-Aktivität stimuliert (Liu et al., 1994). Die Protein Kinase C ist in dem Prozess der Proliferation und Differenzierung involviert (Liu et al., 1994).

Ein weiteres, sehr stark überexprimiertes Gen in der GC-1spg Zelllinie ist das Retrotransposon BVL-1. Generell werden Retrotransposons in invasiven Blasenkarzinomen der Ratte überexprimiert (Grassi et al., 1999). Außerdem wurden in der Literatur einige Fälle beschrieben, bei denen transgene Mäuse, die ein Onkogen überexprimierten, gleichzeitig eine starke Expression eines Retrotransposons aufwiesen (Dupressoir et al., 1997). Im allgemeinen wird vermutet, dass Retrotransposons infolge einer Insertion in Tumorsuppressorgene eine Bedeutung bei der genetischen Prädisposition für Tumore zukommt (Xiao et al., 1995). Eine Überexpression von Histon H3.3 konnte in Karzinomen der Speiseröhre detektiert werden. Darüber hinaus konnte in 9 verschiedenen humanen Adenokarzinom-Zelllinien eine Hochregulierung der Histon H3.3 mRNA dokumentiert werden (Graber et al., 1996).

Alpha-Catenin, das zellulär als Cadherin-assoziiertes Protein vorliegt, wird für die Bildung der „Tight Junctions“ benötigt (Uchida et al., 1996). Interessanterweise berichten nahezu sämtliche Studien in der Literatur von einer deutlich herunterregulierten Expression von alpha-Catenin in Tumorgeweben und Tumorzelllinien (Husmarck et al., 1999; Zhang et al., 1999). Jedoch konnte in einer Rhabdomyosarcom-Zelllinie eine Expression von alpha-Catenin detektiert werden, wohingegen keine Expression von Cadherinen detektiert werden konnte (Soler et al., 1993). Überdies zeigte eine kürzlich publizierte Studie, dass die Expression von alpha-Catenin in Prostatakarzinomen hochreguliert ist (Arenas et al., 2000).

Für die in GC-1spg Zellen überexprimierten Gene LPS-Bindungs-Protein oder das Protektive Protein wird in der Literatur kein direkter Zusammenhang zwischen einer Überexpression und dem Prozess der Tumorgenese erwähnt. Diese Gene können als neue Kandidatengene für den malignen Phänotyp der GC-1spg Zellen verantwortlich sein. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Lipopolysaccharide (LPS) an das LPS-Bindungsprotein binden, das wiederum an den CD14-Rezeptor auf Makrophagen bindet, der für die Freisetzung von Cytokinen, insbesondere TNF, verantwortlich ist (Wright et al., 1990; Schumann et al., 1990). Das Protektive Protein ist ein Glykoprotein, das einen Komplex mit den lysosomalen Enzymen  $\beta$ -Galactosidase und Neuraminidase bildet (Galjart et al., 1990). Der Funktionsverlust dieses Komplexes führt beim Menschen zu der Stoffwechselkrankheit Galactosialidose (Suzuki et al., 1982). Die hier aufgeführten Beispiele lassen die Annahme zu, dass von den bekannten Genen, die in GC-1spg Zellen überexprimiert sind, einige in dem Prozess der Tumorgenese und Invasivität involviert sind (Tab. 7).

Differentiell exprimiertes Gen:	Überexprimiert in:	Referenz:
Integrin alpha 6	Brust-, Prostatakarzinomen, hepatozellulären Karzinomen,	Begum et al. (1995), Rabinovitz et al. (1995), Timmer et al. (1994),
L6 Antigen	Semen-, Ovarial-, Brust- und Dickdarmkarzinomen	Marken et al. (1992)
Annexin VIII	Promyeloischer Leukämie	Chang et al. (1992)
BVL-Retrotransposon	Blasenkarzinom der Ratte	Grassi et al. (1999)
Histon H3.3	Speiseröhrentumoren, Adenokarzinomzelllinien	Graber et al. (1996)
Alpha-Catenin	Prostatakarzinomen	Arenas et al. (2000)

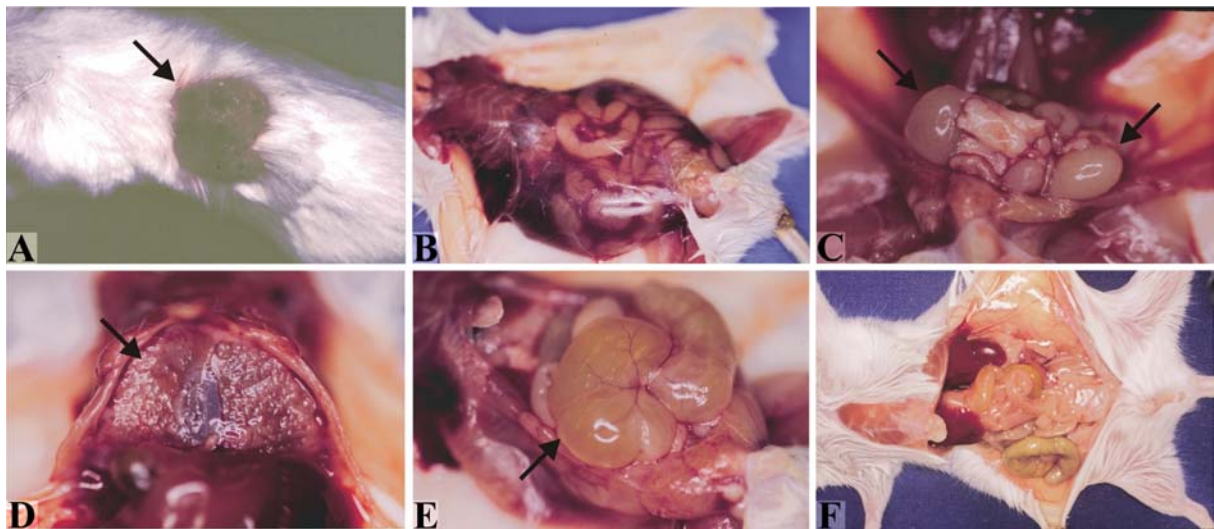
**Tab. 7** Darstellung der bekannten und in GC-1spg überexprimierten Gene, die im Prozess der Tumorgenese und Invasivität involviert sein können.

Von den überexprimierten und bekannten Genen wurden zunächst L6-Antigen, Integrin alpha6 und Annexin VIII für weiterführende Studien ausgewählt. Dabei wurde damit begonnen stabile Transfektanten zu generieren, die über die Verwendung von Antisense-Konstrukten eine erniedrigte Expression der drei o.g. Gene in der GC-1spg Zelllinie aufweisen. Anschließend sollen die transfizierten GC-1spg Zellen auf eine mögliche veränderte Invasivität und Proliferation untersucht werden.

Die durchgeführten Analysen mit den GC-1spg- und GC-4spc Zellen auf der Ebene des Phänotyps und auf der Ebene der Expression zeigen, dass die GC-1spg Zelllinie einen malignen transformierten Phänotyp besitzt (Tascou et al., 2001). Um dieses Ergebnis *in vivo* zu verifizieren, wurden in einem Pilotexperiment GC-1spg- und GC-4spc Zellen jeweils subkutan und intratestikulär in SCID-Mäuse injiziert. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. F. Alves, Abt. Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Göttingen, durchgeführt. Sogenannte SCID (severe combined immunodeficient)-Mäuse sind homozygot für eine Mutation im scid-Gen. Daraus resultiert ein defektes Immunsystem, in dem B- und T-Zellen funktionslos sind, wodurch die Mäuse extrem anfällig gegenüber Infektionen sind (Seydel et al., 1996). SCID-Mäuse können aufgrund ihres defekten Immunsystems nur unter keimfreien Bedingungen gehalten werden. Ihr defektes Immunsystem macht SCID-Mäuse zu einem be-

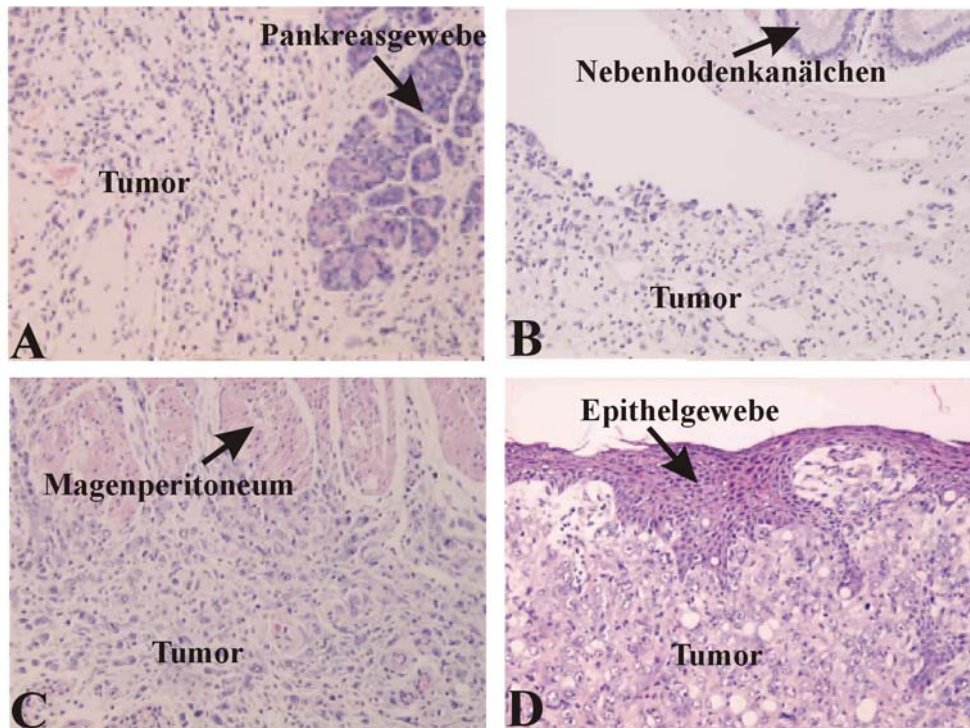
gehrten *in vivo* Modell, um die Auswirkungen viraler, bakterieller, fungaler oder parasitärer Pathogene zu studieren (Seydel et al., 1996).

Nach einer subkutanen Applikation der GC-1spg Zellen in SCID-Mäuse zeigte sich bereits nach 4 Wochen die Ausbildung lokaler Tumore (Abb. 55A). Dahingegen konnte nach einer subkutanen Applikation der GC-4spc Zellen auch nach 8 Monaten kein Tumorwachstum festgestellt werden. Nach einer intratestikulären Applikation der GC-1spg Zellen in SCID-Mäuse ergab sich bereits nach 4 Wochen ein ausgeprägtes Tumorwachstum mit ausgedehnter peritonealer Metastasierung. Es bildeten sich Tumoren in Magen, Pankreas, Nebenhoden, Milz, Zwerchfell, Scrotum und Cäcum (Abb. 55B-E). Dahingegen konnten nach einer intratestikulären Applikation der GC-4spc Zellen in SCID-Mäuse auch nach 8 Monaten keine Anzeichen einer Tumorbildung beobachtet werden (Abb. 55F). Die entstandenen Tumoren werden in Zusammenarbeit mit Prof. L. Füzesi, Abt. Gastroenteropathologie, Universitätsklinikum Göttingen, analysiert. Sämtliche Tumoren zeigen eine identische Histomorphologie (Abb. 56), die Charakteristika eines mesenchymalen Tumors aufweisen. Eine genaue immunhistochemische Charakterisierung der Tumoren wird derzeit durchgeführt.



**Abb. 55** Darstellung der Ergebnisse der subkutanen und intratestikulären Applikation der GC-1spg- und GC-4spc Zellen in SCID-Mäuse. **A)** Nach subkutaner Applikation der GC-1spg Zellen in SCID-Mäuse konnte die Ausbildung eines lokalen Tumors nach 4 Wochen beobachtet werden. **B)** Nach einer intratestikulären Applikation der GC-1spg Zellen in SCID-Mäuse zeigte sich bereits nach 4 Wochen ein starkes Tumorwachstum mit ausgedehnter peritonealer Metastasierung. Deutlich erkennbar ist der Ascites. **C-E)** Exemplarische Darstellung von

Geweben, bei denen Tumoren identifiziert wurden. C) Testes mit tumorösen Nebenhoden. D) Diaphragma E) Cäkum F) Nach einer intratestikulären Applikation der GC-4spc Zellen zeigten sich auch nach 8 Monaten keine Anzeichen einer Tumorentstehung.



**Abb. 56** Exemplarische Darstellung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung der angefertigten Tumorschnitte. Die Aufnahmen entsprechen einer 200fachen Endvergrößerung. **A)** Pankreasgewebe mit juxtaponiertem Tumorgewebe. **B)** Nebenhodenkanälchen mit anliegendem Tumorgewebe. **C)** Magen-Peritoneum mit anliegendem Tumorgewebe. **D)** Epithelgewebe mit anliegendem Tumorgewebe.

Insgesamt betrachtet demonstrieren die erhöhte Invasivität, die erhöhte Expression des Tumormarkers GCAP bzw. seines Maus-homologen EAP und die Ausbildung von Tumoren in SCID-Mäuse eindeutig, dass es sich bei der Spermatogonienzelllinie GC-1spg im Gegensatz zur Spermatozytenzelllinie GC-4spc um eine maligne transformierte Zelllinie handelt.

#### **4. Charakterisierung und funktionelle Untersuchungen zu Nif311 der Maus und NIF3L1 des Menschen**

Von den unbekanntem und in den GC-1spg Zellen überexprimierten Genen, die über SH isoliert wurden, wurde der Klon 45 für weitergehende Untersuchungen ausgewählt. Ziel war es hier ein unbekanntes und differentiell exprimiertes Gen näher zu charakterisieren und mit dem malignen Phänotyp der GC-1spg Zelllinie in Verbindung zu bringen.

##### **4.1 Analyse der Nif311 cDNA der Maus und der NIF3L1 cDNA des Menschen**

Die vollständige cDNA-Sequenz des Klons 45 wurde bei der Maus isoliert. Auf Aminosäureebene zeigt sich in den beiden flankierenden Regionen eine 46%ige Homologie zum „Ngg1 interacting-factor 3“ der Hefe (Accession Nr. S64243). Der Klon 45 wurde daher im weiteren Verlauf mit Nif311 („Ngg1-interacting factor3 like1“) bezeichnet (Tascou et al., 2000). Die Nif311 cDNA der Maus umfasst 1839 bp und kodiert für ein Protein von 376 Aminosäuren. An der Nukleotidposition (1841-1845) konnte ein putativ modifiziertes Polyadenylierungssignal (AUUAAA) lokalisiert werden (Sheets et al., 1990). Solche modifizierten Polyadenylierungssignale wurden bereits für das Transitionsprotein 2 (Kleene et al., 1987) und für Untereinheiten von cAMP-abhängigen Proteinkinasen in männlichen Keimzellen beschrieben (Oyen et al., 1990). Die humane NIF3L1 cDNA umfasst eine Gesamtsequenz von 1426 bp einschließlich eines Poly A-Schwanzes und eines nicht-modifizierten putativen Polyadenylierungssignals (AAUAAA). Der offene Leserahmen von 1131 bp kodiert für ein 377 Aminosäuren großes Protein. Die Nif311 cDNA der Maus und die humane NIF3L1 cDNA zeigen eine 86%ige Homologie auf Nukleotid- und Aminosäureebene. Northern Blot-Analysen detektierten ein Transkript von Nif311 bei ca. 1.85 kb sowie zwei schwächere Transkripte bei ca. 2.4 kb und 3.4 kb. In diesem Zusammenhang zeigten Southern Blot-Analysen mit genomischer DNA der Maus das typische Bandenmuster eines Single Copy-Gens, so dass es sich bei den beiden zusätzlichen Transkripten von Nif311 vermutlich um alternative Spleißprodukte handelt.



## 4.2 Analyse der Primärstruktur des NIF3L1-Proteins

Datenbankrecherchen zeigten, dass sowohl das menschliche NIF3L1-Protein als auch das Maus-homologe Nif3l1-Protein während der Evolution sehr stark konserviert wurde. Dabei reicht die Spannbreite von den Archaeobakterien bis hin zu den Säugern. Interessanterweise treten die Homologien in allen untersuchten Spezies ausschließlich in den beiden flankierenden Regionen auf, d.h. in der N-terminalen Region von ungefähr 191 Aminosäuren und in der C-terminalen Region von ungefähr 83 Aminosäuren. Die mittlere Region von ungefähr 83 Aminosäuren zeigt nur zwischen Maus und Mensch eine signifikante Homologie (Abb. 57). Die größte Homologie zum Nif3l1-Protein der Maus bzw. zum humanen NIF3L1-Protein weist das *Drosophila*-homologe Protein „symbol=anon 35F/36F“ (Accession Nr. AE003416) auf. In den flankierenden Regionen liegt die Homologie bei ca. 41%. Bei der Hefe konnte bei *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* jeweils ein homologes Protein zu NIF3L1 gefunden werden. Der Hefe-“Ngg1-interacting factor 3-homologe” aus *Schizosaccharomyces pombe* (Accession No. AL034490) zeigt 46% Aminosäuresequenzhomologie (Accession No. S64243), und der Hefe- “Ngg1-interacting factor 3 (Nif3)” aus *Saccharomyces cerevisiae* (Accession No. P53081) zeigt 37% Aminosäuresequenzhomologie. Proteine von niederen Organismen wie z.B. das „konservierte hypothetische Protein“ aus *Ureaplasma urealyticum* (Accession No. AE002132), das “hypothetische Protein SCC30.09c aus *Streptomyces coelicolor* (Accession No. AL352972), das “konservierte hypothetische Protein“ aus *Helicobacter pylori* (Accession Nr. HP0959) oder das “hypothetische Protein” aus *Methanococcus jannaschii* (Accession Nr. Q58337) zeigen 25-30% Aminosäuresequenzhomologie zu den beiden flankierenden Regionen des humanen NIF3L1-Proteins und des Nif3l1-Proteins der Maus.



## IV. Diskussion

**Abb. 57** Aminosäuresequenzvergleich zwischen dem Nif311-Protein der Maus und dem humanen NIF3L1-Protein mit homologen Proteinen verschiedener Spezies innerhalb der Evolution. Dargestellt sind das *Drosophila* „symbol=annon 35F/36F“ –Protein (Accession No. AE003416), der Hefe “Ngg1-interacting factor 3–homologe” (Nif3h) aus *Schizosaccharomyces pombe* (Accession No. AL034490), der Hefe “Ngg1- interacting factor 3” (Nif3) aus *Saccharomyces cerevisiae* (Accession No. P53081) und das konservierte hypothetische Protein aus *Ureaplasma urealyticum* (Accession No. AE002132). Aminosäuren, die identisch zur Maus- und zur humanen NIF3L1 Aminosäuren-Sequenz sind, wurden in schwarzem Hintergrund dargestellt. Aminosäuren, die eine funktionelle Ähnlichkeit zur entsprechenden Maus- und menschlichen Aminosäuresequenz aufweisen, wurden mit grauem Hintergrund dargestellt. Die eingeführten Lücken dienen einer übersichtlicheren Darstellung der Homologien.

Über das Computerprogramm ScanProsite (II. 6.7) wurden insgesamt 22 putative Phosphorylierungsstellen für Serin- und Threoninkinasen innerhalb der NIF3L1 Aminosäuresequenz identifiziert (Tab. 8).

Phosphorylierungsstelle für:	Position:	Aminosäuresequenz:
cAMP- u. cGMP-abhängige Proteinkinasen	101-104	KRIT
Protein Kinase C	12-14 23-25 107-109 149-151 198-200 214-216 342-344 369-371	TVR SSR TWK TSR SAR TQK TER TDR
Casein Kinase II	26-29 36-39 44-47 107-110 128-131 201-204 255-258 264-267 320-323 340-343 356-359 367-370 369-372	SFMD SLND SFAE TWKE TAYD TGNE TLDE TMID SHHD SNTE SHLE SETD TDRD

**Tab. 8** Tabellarische Darstellung der 22 putativen Phosphorylierungsstellen für Serin- und Threoninkinasen in der humanen NIF3L1 Aminosäuresequenz.

### 4.3 Expressionsanalysen von NIF3L1

Expressionsanalysen mit verschiedenen Zelllinien der Maus zeigten eine starke Überexpression von Nif3l1 in der GC-1spg Zelllinie (Hofmann et al., 1992) sowie in der F9-Teratokarzinom-Zelllinie (Sherman et al., 1976). In Northern Blot-Analysen wurde unter Verwendung von RNAs aus verschiedenen Geweben der Maus eine ubiquitäre Expression von Nif3l1 detektiert. Darüber hinaus konnte in verschiedenen embryonalen Stadien der Maus sowie in ES-Zellen eine Expression von Nif3l1 durch die gesamte embryonale Entwicklung festgestellt werden. Dies korreliert mit den Expressionsdaten aus der EST-Datenbank, die ein breites Expressionsmuster von Nif3l1 in sämtlichen Entwicklungsstadien und in sämtlichen Geweben dokumentiert.

### 4.4 Chromosomale Lokalisation des NIF3L1-Gens

Das Nif3l1-Gen der Maus konnte auf Chromosom 1, Region C über Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung lokalisiert werden. In der humanen NIF3L1 cDNA -Sequenz konnte der STS (sequence tagged site)-Marker stSG2762 gefunden werden, so dass das humane Gen auf Chromosom 2q33 im Intervall D2S115-D2S307 (201.7 cM- 205.4 cM) lokalisiert werden konnte. Auf Chromosom 2q33 ist die familiäre Form der Amyotrophen Lateralsklerose 2 (ALS2) lokalisiert (Hentati et al., 1994). Die ALS2 wird autosomal rezessiv vererbt und kennzeichnet sich durch eine progressive Degeneration von Motorneuronen aus (Siddique et al., 1996). In der Studie von Hadano et al. (2001) wurden drei verschiedene Gene der o.g. chromosomalen Region isoliert und auf Mutationen bei Patienten mit ALS2 in den jeweiligen Transkripten oder in den Exon-Intron-Übergängen analysiert. Unter den analysierten Genen befand sich auch NIF3L1 $\alpha$ -1, eine Spleißvariante von NIF3L1, die in Abschnitt III. 7.4 erstmals eingeführt wurde. Die analysierten Gene einschließlich NIF3L1 $\alpha$ -1 zeigten jedoch keine Mutationen und stehen vermutlich nicht im direkten kausalen Zusammenhang mit der ALS2. Zu berücksichtigen bleibt jedoch, dass in der durchgeführten Studie nur der offene Leserahmen der jeweiligen Gene auf Mutationen analysiert wurde, nicht jedoch die 5'- und 3'- regulatorischen Sequenzen. Darüber hinaus wurde nicht NIF3L1 sondern die Spleißvariante

NIF3L1 $\alpha$ -1, die für ein trunkiertes Protein von 350 Aminosäuren kodiert, auf Mutationen untersucht.

### 4.5 Putative zelluläre Funktion von NIF3L1

Über die Funktion von Nif311 ist in der Literatur gegenwärtig nichts beschrieben. Jedoch wurde das homologe Protein der Hefe, der „Ngg1-interacting factor 3“ (Nif3), in der Literatur erstmals in der Studie von Martens et al. (1996) erwähnt. Unter Verwendung einer Hefe cDNA –Bibliothek konnte im Yeast-Two-Hybrid-System gezeigt werden, dass Nif3 mit der N-terminalen Domäne von Ngg1 interagiert (Martens et al., 1996). Über die Funktion dieser Interaktion ist jedoch nichts bekannt. Ngg1 stellt ein 702 Aminosäuren großes Protein dar und wurde erstmals von Brandl et al. (1993) beschrieben. Das Ngg1-Protein wird in der Hefe für eine Glucose Repression GAL4-regulierter Gene benötigt. Vermutet wird, dass Ngg1 die transkriptionelle Aktivität von GAL4 in Glucose-Medium durch eine Inhibition der DNA-Bindungsdomäne oder der Aktivierungsdomäne erniedrigt (Brandl et al., 1993). Aus diesem Grund geht man davon aus, dass Ngg1 im Kern agiert. Innerhalb der Aminosäuresequenz von Ngg1 befindet sich ein putatives Kernlokalisierungssignal, und Deletionsanalysen in dieser Region manifestierten eine deutlich verminderte Aktivität von Ngg1 (Brandl et al., 1993). Der Bindungspartner „Ngg1 interacting factor3“ (Nif3) der Hefe besitzt hingegen kein putatives Kernlokalisierungssignal und ist gemäß der theoretischen Vorhersage des Computerprogramms pSORT II (II. 6.7) mit einer 70%igen Wahrscheinlichkeit im Cytoplasma lokalisiert.

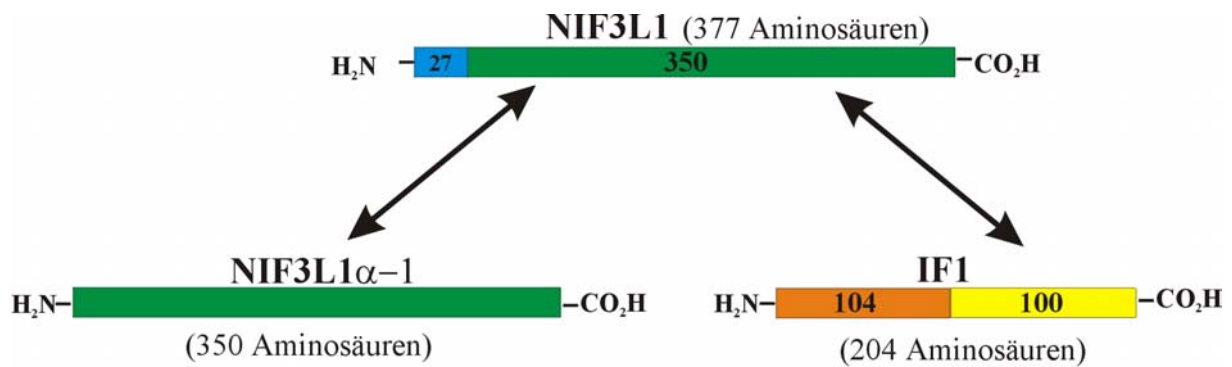
Im Hinblick auf eine zelluläre Signaltransduktion zwischen Ngg1 und seinem Interaktionspartner Nif3 ergeben sich demzufolge mehrere Möglichkeiten. So könnte es beispielsweise sein, dass Nif3 die Funktion eines Retentionsfaktors besitzt, der durch eine Interaktion die Translokation von Ngg1 in den Nukleus verhindert. Dieses Phänomen wurde für den Transkriptionsfaktor NFkappaB und sein Inhibitorprotein IkappaB beschrieben. Durch die Interaktion von NFkappaB mit IkappaB wird das Kernlokalisierungssignal (NLS) von NFkappaB unzugänglich gemacht, so dass Transportproteine nicht mehr an das Kernlokalisierungssignal binden können und der Komplex, bestehend aus NFkappaB und IkappaB, im Zytoplasma verbleibt. Eine intrazelluläre proteolytische Degradation von IkappaB zerstört den Komplex, wodurch NFkappaB in den Nukleus transportiert wird, wo es die Genexpressi-

on initiiert (Li et al., 1998; Lentsch et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Nif3 im Kotransport mit Ngg1 in den Nukleus wandert. Diese Situation wurde bereits für Interleukin-5 (IL-5) und seine Rezeptor-Untereinheit beschrieben (Lentsch et al., 1999). Das Verständnis der Kern-Zytoplasma Interaktion zwischen Ngg1 und Nif3 könnte gleichzeitig entscheidend für das Verständnis der Funktion dieser Interaktion sein.

Eine analoge Situation lässt sich auf das humane NIF3L1 beziehen, das ebenfalls kein Kern-lokalisierungssignal besitzt und über ein GFP-Fusionsprotein im Zytoplasma lokalisiert wurde. Aufgrund der bekannten Daten der homologen Proteine der Hefe ist die Existenz eines Interaktionspartners analog zum Ngg1 der Hefe, der in einer ähnlichen Kern-Zytoplasma Interaktion involviert ist, in anderen Spezies sehr wahrscheinlich. Überdies suggerieren das ubiquitäre Expressionsmuster von Nif311 sowie die Existenz homologer Proteine von Nif311 während der gesamten Evolution bis hin zu einzelligen Organismen eine Funktion von Nif311 innerhalb der Zelle, die unabhängig von einem bestimmten Zell- oder Gewebetyp ist.

### **4.6 Isolierung von Interaktionspartnern für NIF3L1**

Über ein Yeast-Two-Hybrid-Screening, bei dem ca.  $1.6 \times 10^6$  Klone getestet wurden, konnten aus einer HeLa cDNA-Bibliothek zwei Interaktionspartner für NIF3L1 isoliert werden. Ein Interaktionspartner repräsentiert eine Spleißvariante von NIF3L1. Diese wurde NIF3L1 $\alpha$ -1 benannt und zeichnet sich dadurch aus, dass im 5'-Bereich des Gens eine 213 bp große Region alternativ gespleißt wird. Dies führt zur Bildung eines trunkierten Proteins mit einer Größe von 350 Aminosäuren. Die 27 Aminosäuren am N-Terminus von NIF3L1 fehlen bei der Spleißvariante NIF3L1 $\alpha$ -1 (III. 7.4) (Abb. 58). Der zweite Interaktionspartner repräsentiert ein unbekanntes 204 Aminosäuren großes Protein, dessen humane cDNA in den öffentlichen Datenbanken unter der Registriernummer AK027098 eingetragen ist. Dieses Protein wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen mit IF1 (Interacting factor 1) bezeichnet (Abb. 58). Über das Yeast-Two-Hybrid Screening konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Region von 100 Aminosäuren bei IF1 für eine Interaktion mit NIF3L1 ausreichend ist (Abb. 58).



**Abb. 58** Schematische Darstellung der Interaktion von NIF3L1 mit seinen Bindungspartnern NIF3L1 $\alpha$ -1 und IF1. Die Spleißvariante NIF3L1 $\alpha$ -1 kodiert für ein trunkeertes Protein von 350 Aminosäuren, die 27 Aminosäuren am N-Terminus von NIF3L1 fehlen hier. Für eine Interaktion von NIF3L1 mit dem Bindungspartner IF1 wird nur dessen C-terminale Region von 100 Aminosäuren benötigt.

Obwohl der Anteil falsch-positiver Klone in Yeast-Two-Hybrid-Screenings aufgrund effektiver Selektionsmethoden beträchtlich reduziert wurde (Bartel et al., 1993), ist es weiterhin notwendig, spezifische Interaktionen von solchen zu unterscheiden, die zufällig zustandekommen, wenn die betroffenen Proteine in Hefezellen ektopisch überexprimiert werden. Für eine Verifikation der in der Hefe gefundenen Interaktionen wurde ein *in vitro* Bindungsassay (GST-Pulldown) durchgeführt. Dabei konnte die Interaktion zwischen NIF3L1 und seiner Spleißvariante NIF3L1 $\alpha$ -1 reproduziert werden. Die Interaktion zwischen NIF3L1 und IF1 war dagegen durch diese Methode nicht verifizierbar. Hierfür gibt es mehrere Erklärungen. So ist es möglich, dass es aufgrund einer sterischen Behinderung, die durch die GST (Glutathion S-Transferase) verursacht wird, zwischen dem Fusionssystem GST-IF1 und NIF3L1 zu keiner Wechselwirkung kommen kann. Ein anderes Problem ist die Tatsache, dass die untersuchten Proteine NIF3L1, GST-NIF3L1 $\alpha$ -1 und GST-IF1 jeweils in prokaryotischen Zellen exprimiert wurden, in denen eventuell die ordnungsgemäße und für eine spezifische Interaktion essentielle Proteinfaltung nicht ausgeführt wird.

Um die in der Hefe gefundenen Interaktionen in einem weiteren unabhängigen System zu verifizieren, wurde das Mammalian-Two-Hybrid-System angewendet. Dieses zeichnet sich dadurch aus, sehr stringent zu sein, darüber hinaus lassen sich die Ergebnisse sehr gut reproduzieren (Tsan et al., 1997). Der wichtigste Vorteil des Mammalian-Two-Hybrid-Systems ist

jedoch die Tatsache, dass es im Gegensatz zum GST-Pulldown oder zur Co-Immunpräzipitation relativ wenig von äußeren Parametern wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Salz-Konzentration etc. beeinflussbar ist. Mit dem Mammalian-Two-Hybrid-System konnte sowohl die Interaktion zwischen NIF3L1 und NIF3L1 $\alpha$ -1 als auch die Interaktion zwischen NIF3L1 und IF1 reproduziert werden. Die analysierten Luciferase-Aktivitäten waren signifikant höher als die der verwendeten Negativkontrollen. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die im Yeast-Two-Hybrid gefundenen Interaktionen im Mammalian-Two-Hybrid reproduzierbar waren.

## 5. Charakterisierung von IF1

### 5.1 Analyse der IF1-cDNA

Das humane IF1-Gen wurde erstmals in der Studie von Kleiderlein et al. (1998) beschrieben, bei der man gezielt 18 neue Kandidatengene für neuropsychiatrische Krankheiten isolierte, die charakteristische repetitive Triplettssequenzen aufweisen. In dieser Studie wurde die humane „full-length“ IF1-cDNA Sequenz isoliert und in den öffentlichen Datenbanken registriert (Accession Nr. AK027098). Über die Funktion des IF1-Gens ist jedoch nichts bekannt. Die humane IF1 cDNA –Sequenz kennzeichnet sich durch eine charakteristische repetitive Triplettssequenz in Form einer (GCC)<sub>9</sub>-Wiederholung in der 5'-UTR aus (III. 10.1). Repetitive Triplettssequenzen sind für eine Reihe von neuropsychiatrischen Krankheiten verantwortlich (McInnis et al., 1996; Ross et al., 1998). Einige (GCC)<sub>n</sub>-Wiederholungen in nichtkodierenden Bereichen können sich von einer normalen Anzahl von 10 bis 50 Kopien auf Hunderte oder sogar Tausende aneinandergereihter Grundelemente ausdehnen. Aus noch unbekanntem Gründen beeinflussen solche Wiederholungssequenzen die DNA-Methylierung und die Chromatinstruktur. Es entstehen Bruchstellen in den Chromosomen (Strachan et al., 1996). Gleichzeitig wird die Expression benachbarter Gene gehemmt (Feng et al., 1995). Beim Fragilen-X-Syndrom beispielsweise führt eine umfangreiche Verlängerung von (CGG)<sub>n</sub>-Sequenzen zu einem Funktionsverlust des FRM-1-Gens, und zwar durch die Methylierung des Promotors (Feng et al., 1995). Die humane IF1 cDNA zeigt auf Nukleotidebene eine 90%ige Homologie zur If1 cDNA der Maus.



## 5.2 Analyse der Primärstruktur des IF1-Proteins

Das humane IF1-Protein zeigt eine 97%ige Homologie (97% Identität, 99% Ähnlichkeit) zum homologen If1-Protein der Maus (Abb. 59). Eine Homologie zu Proteinen anderer Spezies konnte ebenfalls gefunden werden. Ein Protein aus *Drosophila melanogaster* CG17143 (Accession Nr. AE003467) zeigt eine 32%ige Homologie (32% Identität; 49% Ähnlichkeit), ein unbekanntes Protein aus *Arabidopsis thaliana* (Accession Nr. ACO18363) besitzt eine 30%ige Homologie (30% Identität; 47% Ähnlichkeit) und ein hypothetisches Protein aus *Caenorhabditis elegans* (Accession Nr. T18778) zeigt eine 23%ige Homologie (23% Identität; 40% Ähnlichkeit) auf Aminosäureebene zum humanen IF1-Protein (Abb. 59).

h IF1	-----MGAVTDDEVIKRLRLIDGDGAGGDRRINLVKSEIKWC	38
m If1	-----MGAVTDDEVIKRLRLIDGDGAGDRRINLVKSEIKWC	38
Drosophila	-----	
Arabidopsis	MSVKARRISGRLETVVTKVNYAFDPVDDDKIIRNRLLRTRTTTTRGPPPKKQKETSFV	60
h IF1	NSGS- <b>QEEGYSQY</b> --- <b>QRMLSTLSQCF</b> FSMGKTLVYDMNLRE <b>MENYEKTYKEIECSIA</b>	93
m If1	NSGS- <b>QEEGYSQY</b> --- <b>QRMLSTLSQCF</b> FSMGKTLVYDMNLRE <b>MENYEKTYKEIECSIA</b>	93
Drosophila	-----MY--- <b>DRLMAQFAQCKL</b> ALKNVQTL <b>QMTAGERDNYTQVVEHHEESIV</b>	45
Arabidopsis	LEVDK <b>EEENY</b> DCGR <b>LAKAF</b> IQ <b>ELSTFEI</b> PL <b>LKSQAVVEANLREKESFNEVKDETERQIM</b>	120
h IF1	<b>GAHEKTAEC</b> KKQILQAK <b>IRKNRQ</b> EYDALAK <b>VIQHH</b> PDR <b>HETLKELEALGKELEHLSHIK</b>	153
m If1	<b>GAHEKTAEC</b> KKQILQAK <b>IRKNRQ</b> EYDALAK <b>VIQHH</b> PDR <b>HETLKELEALGKELEHLSHIK</b>	153
Drosophila	<b>LAKAEIES</b> SK <b>ELITAKO</b> IRKN <b>KMEYDL</b> LAS <b>LIQDQ</b> PDR <b>SETQFH</b> ET <b>TRREIDDLVQKK</b>	105
Arabidopsis	<b>QAKAETE</b> DL <b>KKOLEES</b> KID <b>ROHKE</b> EC <b>ETRK</b> L <b>SAQPP</b> RS <b>ETEKV</b> I <b>YELNKE</b> L <b>AELEAES</b>	180
h IF1	<b>ESVEDKLELRRKQFHVLLSTIHE</b> LQOTLE <b>NDK--LSEVEEAQ</b> EAS <b>ME</b> S <b>DPKP</b> -----	204
m If1	<b>ESVEDKLELRRKQFHVLLSTIHE</b> LQOTLE <b>NDK--LSEVDEAQ</b> EST <b>MEAD</b> PKP-----	204
Drosophila	<b>LKMERK</b> FOR <b>RRNDF</b> T <b>LLMYT</b> HE <b>LEQQLDQ</b> SS-- <b>SSASS</b> SS <b>DC</b> AR <b>SE</b> PD <b>LD</b> NGIME	164
Arabidopsis	<b>TASWR</b> L <b>LELRRKQF</b> ALL <b>LMHV</b> DE <b>LQNT</b> ME <b>EQK</b> SL <b>VDE</b> IR <b>SASE</b> D <b>QR</b> NIT <b>DAM</b> SVD----	236
h IF1	-----	
m If1	-----	
Drosophila	VSEDDDLNNS <b>TPTK</b> FDG <b>ARGE</b> PK <b>YHS</b> V <b>STED</b> SK <b>AMS</b> VEED <b>TVLE</b> LSID <b>KDE</b> HD <b>VDA</b> VAN	224
Arabidopsis	-----	

**Abb. 59** Aminosäuresequenzvergleich zwischen dem humanen IF1-Protein und dem If1-Protein der Maus mit homologen Proteinen verschiedener Spezies innerhalb der Evolution. Dargestellt sind das *Drosophila*-Protein CG17143 (Accession Nr. AAF47350) und ein unbekanntes Protein aus *Arabidopsis thaliana* (Accession Nr. AAF26964). Aminosäuren, die identisch zur Maus- und zur humanen IF1- Aminosäuren-Sequenz sind, wurden in schwarzem Hintergrund dargestellt. Aminosäuren, die eine funktionelle Ähnlichkeit zur entsprechenden Maus- und menschlichen Aminosäure aufweisen, wurden mit grauem Hintergrund dargestellt. Die eingeführten Lücken dienen zu einer übersichtlicheren Darstellung der Homologien.

Über das Computerprogramm ScanProsite (II. 6.7) konnten in der Aminosäuresequenz des humanem IF1-Proteins insgesamt 8 putative Phosphorylierungsstellen für Serin/Threonin Kinasen identifiziert werden (Tab. 9)

Phosphorylierungsstellen für:	Position:	Aminosäuresequenz:
Protein Kinase C	135-137	TLK
Casein Kinase II	5-8 42-45 58-61 135-138 155-158 173-176 188-191	TDDE SQEE SQCE TLKE SVED TIHE SEVE

**Tab. 9** Darstellung der putativen Phosphorylierungsstellen für Serin-/Threoninkinasen in der Aminosäuresequenz des humanen IF1-Proteins.

### 5.3 Expressionsanalysen von If1

Northern Blot-Analysen mit RNAs aus verschiedenen Geweben der Maus sowie GC-1spg-, GC-4spc- und F9 RNA sowie RNA aus ES-Zellen zeigten eine ubiquitäre Expression von If1. Ein Transkript konnte bei ca. 1.1 kb detektiert werden, und ein weiteres, relativ schwächer exprimiertes Transkript konnte bei ca. 2.3 kb detektiert werden. Eine Überexpression von If1 in der GC-1spg Zelllinie analog zum Nif311 konnte nicht beobachtet werden. Da If1 auch in ES-Zellen exprimiert wird, lässt sich schlussfolgern, dass es analog zum Nif311 durch die gesamte Embryonalentwicklung exprimiert wird. Dies korreliert gleichzeitig mit den Informationen aus der EST-Datenbank, die ein breites Expressionsmuster von If1 in einer Vielzahl von Geweben und in verschiedenen embryonalen Stadien angeben.

### 5.4 Chromosomale Lokalisation von IF1

Über einen STS (sequence tagged site)-Marker konnte das humane IF1-Gen auf Chromosom 3p14.1 im Intervall D3S1289-D3S1547 (69.1-77.4 cM) lokalisiert werden. „Loss-of heterozygosity“ (LOH)-Studien zeigten häufige Deletionen in dieser chromosomalen Region bei

Patienten mit Brustkarzinomen (Bergthorsson et al., 1998), Cervixkarzinomen (Chung et al., 2000) und Nierenzellkarzinomen (Maestro et al., 2000). Diese Studien bestätigen die Tatsache, dass in der o.g. chromosomalen Region Tumorsuppressorgene lokalisiert sein könnten. Das IF1-Gen weist in der 5'-UTR eine repetitive Triplettssequenz in Form einer (GCC)<sub>9</sub>-Wiederholung auf (IV. 5.1). In verschiedenen Studien wurde bereits ein Zusammenhang zwischen repetitiven (GCC)-Triplettssequenzen und chromosomalen Rearrangements demonstriert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Mechanismus der chromosomalen Deletionen beim Jacobsen Syndrom mit repetitiven (GCC)-Triplettssequenzen zusammenhängt, die nahe den Deletionsbruchpunkten lokalisiert sind (Jones et al., 2000). In der kürzlich publizierten Studie von Auer et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL), die grundsätzlich eine sehr häufige Deletion in der chromosomalen Region 11q22-23 aufweisen (Stilgenbauer et al., 1996), der Deletionsbruchpunkt nahe einer repetitiven (CCG)<sub>12</sub>-Sequenz lokalisiert ist. Überdies zeigten Patienten mit CLL eine signifikante Zunahme in der Kopienanzahl dieser repetitiven Triplettssequenz (Auer et al., 2001). Aufgrund dieser beschriebenen Tatsachen gilt das IF1-Gen als ein Kandidat für ein Tumorsuppressorgen.

### 5.5 Zelluläre Lokalisation von IF1

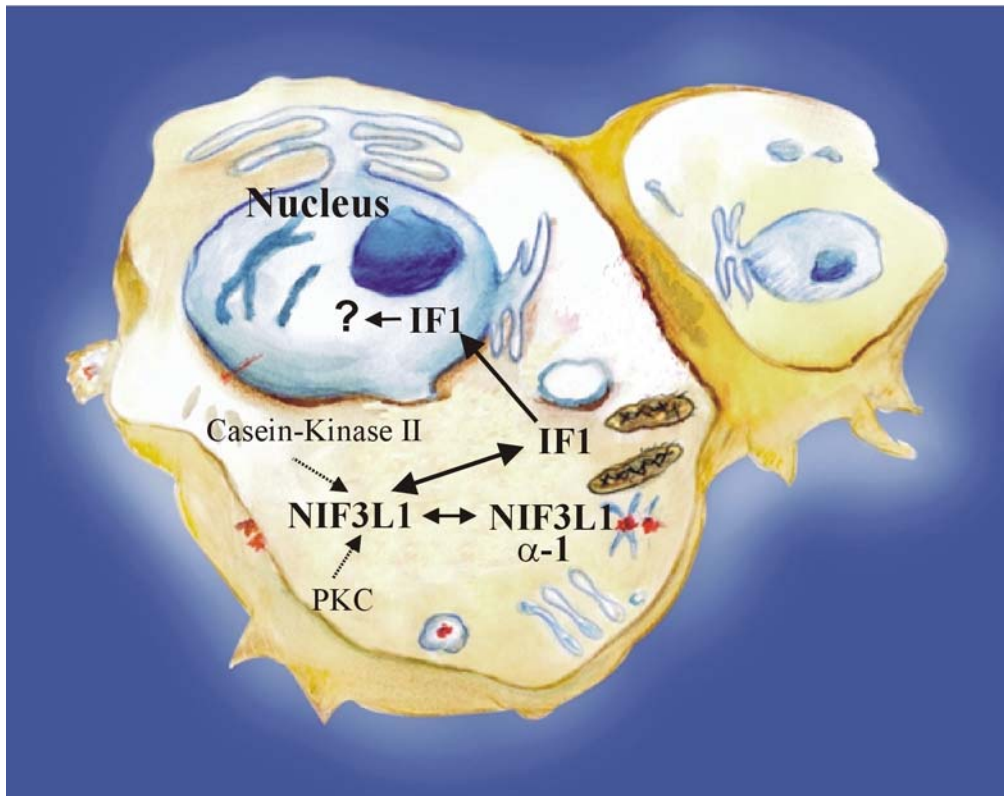
Über ein GFP-Fusionsprotein konnte die zelluläre Lokalisation des humanen IF1-Proteins sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus bestimmt werden. Dies korreliert mit der theoretischen Vorhersage durch das Computerprogramm pSORT II, das das Protein mit einer 75%igen Wahrscheinlichkeit im Nukleus vorhersagt. Da die IF1 Aminosäuresequenz kein klassisches Kernlokalisierungssignal (NLS) enthält, ergeben sich verschiedene Möglichkeiten für einen nuklearen Import. Generell besteht für Ione, kleine Metaboliten und globuläre Proteine unter 60 kDa die Gelegenheit über die mit Wasser gefüllten Kanäle des Kernporenkomplexes (NPC=nuclear pore complex) in den Kern zu diffundieren (Mattaj et al., 1998). Eine weitere Möglichkeit, für Proteine ohne NLS in den Kern zu gelangen, besteht im Kotransport mit einem Kernprotein. Ein klassisches Beispiel hierfür ist das Transkriptionsregulatorprotein STAT1, das keine NLS-Sequenz besitzt. Im inaktiven Zustand ist es im Zytoplasma lokalisiert. Durch eine externe Stimulation wird eine Tyrosin-Phosphorylierung an STAT1 angeregt, die zu einer Dimerbildung führt. Das STAT1-Dimer bindet an das zur Importin Familie

gehörende Protein hSRP1/NP-1, und dieser entstandene Komplex wandert dann gemeinsam in den Nukleus (Mattaj et al., 1998).

### 6. Evaluation der Interaktionen von NIF3L1

Das Two-Hybrid-System erlaubt keine Aussage darüber, ob die gefundenen Interaktionen zwischen IF1-NIF3L1 und NIF3L1-NIF3L1 $\alpha$ -1 von biologischer und physiologischer Relevanz sind. Eine Möglichkeit, die Interaktionen *in vivo* zu verifizieren, besteht über die Methode der Co-Immunpräzipitation. Dennoch indizieren sowohl das Expressionsmuster als auch die zelluläre Lokalisation von IF1, dass es sich hier um eine physiologische Interaktion mit NIF3L1 handelt. Im Hinblick auf die Interaktion zwischen NIF3L1 und IF1 ist das Expressionsmuster beider Proteine kompatibel. Die Tatsache einer ubiquitären Expression in sämtlichen Geweben sowie einer Expression durch die gesamte embryonale Entwicklung beider Proteine lässt auf eine Funktion beider Partner innerhalb der Zelle schließen, die unabhängig von einem speziellen Gewebe- oder Zelltyp ist. Dafür spricht auch die Tatsache, dass beide Proteine während der Evolution hoch konserviert wurden. Darüber hinaus gibt es NIF3L1 homologe Proteine in einzelligen Organismen (IV. 4.2).

Die zelluläre Lokalisation beider Proteine ist ebenfalls kompatibel, denn sowohl IF1 als auch NIF3L1 konnten im Zytoplasma lokalisiert werden. IF1 wurde außerdem auch im Nucleus lokalisiert. Folglich finden sämtliche Interaktionen sowohl von NIF3L1-IF1 als auch von NIF3L1-NIF3L1 $\alpha$ -1 im Zytoplasma statt. Die Tatsache, dass NIF3L1 zahlreiche putative Phosphorylierungsstellen für die Protein Kinase C und die Casein Kinase II aufweist, suggeriert, dass diese Enzyme ebenso im Prozess der Signaltransduktion von NIF3L1 involviert sind. Da das IF1-Protein sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus lokalisiert werden konnte, bietet sich hier die Möglichkeit einer Shuttle-Funktion für IF1. Shuttle-Proteine, die zwischen dem Zytoplasma und dem Nucleus pendeln, besitzen häufig Transportfunktionen oder regulatorische Funktionen (Mattaj et al, 1998). Die Aminosäuresequenz von IF1 weist jedoch keine DNA-bindende Domäne auf, dies suggeriert, dass IF1 mit weiteren Proteinen im Nucleus interagiert (Abb. 60)



**Abb. 60** Schematische Darstellung der zellulären Signaltransduktion von NIF3L1. NIF3L1 interagiert sowohl mit NIF3L1 $\alpha$ -1 als auch mit IF1 im Zytoplasma. IF1 ist außerdem im Nucleus lokalisiert, wo es vermutlich mit weiteren Bindungspartnern interagiert. Aufgrund der zahlreichen putativen Phosphorylierungsstellen für die Protein Kinase C (PKC) und die Casein Kinase II in der Aminosäuresequenz von NIF3L1, kann vermutet werden, dass diese Kinasen ebenfalls im Signaltransduktionsprozess involviert sind.

Über die hier vorgestellten Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien konnte gezeigt werden, dass NIF3L1 mit seiner Spleißvariante NIF3L1 $\alpha$ -1 interagiert. Diese Variante der Selbstassoziation könnte sich funktionell positiv oder negativ auf die Interaktion mit dem IF1-Protein auswirken. In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise in einer kürzlich publizierten Studie gezeigt werden, dass das SMN („survival of motor neuron“-) Gen, das in 98% aller Patienten mit spinobulärer Muskelatrophie (SMA) mutiert vorliegt (Lefebvre et al., 1995), für ein Protein kodiert, das mit sich selbst interagiert und dabei Oligomere bildet. Zusätzlich bindet das SMN-Protein an das „SMN-interacting protein 1“ und an verschiedene kleine SM-Ribonukleoproteine (snRNP-SM-Proteine) (Liu et al., 1997). Letztere Proteine sind essentiell für einen korrekt ablaufenden Spleißprozess der Gene. In der Studie von Pellizzoni et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung des SMN-Proteins essentiell ist für die Bindung der snRNP –SM-Proteine. In Patienten mit einer Mutation im SMN-Gen ist die

Fähigkeit des Proteins zu oligomerisieren gestört, wodurch es zu keiner Bindung der snRNP-SM-Proteine kommt (Pellizoni et al., 1999).

Generell können die erwähnten Selbstassoziationen von Proteinen auch negativ-regulierende Funktionen haben. So konnte diesbezüglich für den Transkriptionsfaktor c-Myb gezeigt werden, dass er nur als Monomer trans-aktiv ist und an die DNA binden kann. Eine negative Autoregulation von c-Myb erfolgt durch eine Homodimerbildung über Leucin-Zipper-Domänen, wodurch es zu keiner weiteren Bindung an die DNA kommt (Nomura et al., 1993). Die hier dargestellten Beispiele positiver oder negativer regulierender Effekte durch eine Homomerbildung lassen sich in ähnlicher Weise auf die Situation von NIF3L1 beziehen. So könnte die Interaktion mit NIF3L1 $\alpha$ -1 einen verstärkenden oder inhibierenden Effekt auf die Interaktion mit IF1 haben.

NIF3L1 besitzt 22 putative Phosphorylierungsstellen für die Protein Kinase C, die Casein Kinase II oder für cAMP-abhängige Kinasen (IV. 4.2). Dies wirft die Frage auf, in welchem Zusammenhang diese putativen Phosphorylierungsstellen mit der strukturellen Konformation des NIF3L1-Proteins stehen, und welchen Einfluss sie auf die Interaktionen mit NIF3L1 $\alpha$ -1 und IF1 besitzen. In dieser Hinsicht konnte beispielsweise für das HSP27 (heat shock protein) gezeigt werden, dass es als Homomultimer vorliegt und erst durch eine Phosphorylierung zweier Serin-Reste eine Konformationsumwandlung zum Homodimer erfolgt (Lambert et al., 1999). *In vitro* Studien zeigten, dass HSP27 in Stress-Situationen nur im unphosphorylierten Zustand die Aktin-Polymerisierung der Zelle reguliert. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass nur homomultimere HSP27-Komplexe bestimmte andere HSP-Proteine binden können (Lambert et al., 1999).

Insgesamt konnte in den durchgeführten Studien die Existenz eines neuen Nucleus-Zytoplasma Signaltransduktionsweges zwischen NIF3L1 und IF1 aufgezeigt werden. Die Tatsache einer ubiquitären Expression sowie einer Expression durch die gesamte Embryonalentwicklung suggeriert eine funktionelle Bedeutung dieses Signaltransduktionsweges innerhalb der Zelle, die unabhängig von einem bestimmten Zell- oder Gewebetyp ist. Außerdem lässt die Konservierung der Aminosäuresequenzen beider Proteine auf einen relativen Erhalt dieses Signaltransduktionsweges während der Evolution schließen.

## **7. Ausblick auf weiterführende Arbeiten**

### **7.1 Weiterführende Analyse der TSPY-LTA transgenen Mäuse**

Über den experimentellen *in vitro*-Ansatz konnte demonstriert werden, dass Spermatogonien die Potenz zur malignen Transformation besitzen. In folgenden Studien soll untersucht werden, ob dieses Ergebnis *in vivo* reproduziert werden kann. In dieser Hinsicht ist die weiterführende Analyse der TSPY-LTA transgenen Mäuse relevant. Ziel ist es weiterhin, homozygote TSPY-LTA transgene Mäuse zu züchten und diese auf eine spezifische Expression des LTA in Spermatogonien evtl. über Immunhistochemie oder *in situ* Hybridisierungen zu analysieren. Die transgenen Mäuse sollen über einen Zeitraum von mindestens 20 Monaten auf eine mögliche Tumorentstehung im Testis beobachtet werden. Analog zu den PGK2-LTA transgenen Mäusen ist zu erwarten, dass sich hier ebenfalls ein Effekt des Transgens LTA auf die Proliferations- und die Apoptoseregulation der Keimzellen ergibt. Aus diesem Grund sollen auch hier verschiedene Keimzellstadien wie Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatisiden in verschiedenen Altersstufen quantifiziert werden.

### **7.2 Charakterisierung der überexprimierten Gene in der GC-1spg Zelllinie**

Ein weiteres Vorhaben ist es, die in der Spermatogonienzelllinie GC-1spg differentiell exprimierte Gene detailliert zu charakterisieren, da diese Kandidatengene für den malignen Phänotyp der GC-1spg Zellen sind. Hierfür soll in „gain of function“ und „loss of function“-Experimenten die Funktionalität dieser Gene untersucht werden. Zum einen sollen stabile Transfektanten generiert werden, in denen ausgewählte, differentiell exprimierte Gene gezielt in der GC-4spc Zelllinie unter der Kontrolle eines ubiquitär-aktiven Promotors überexprimiert werden (gain of function). Anschließend sollen diese transfizierten Zelllinien auf ihre Proliferation und Invasion hin untersucht werden und mit der GC-1spg Zelllinie verglichen werden. Überdies sollen die transfizierten Zellen erneut in SCID-Mäuse appliziert werden. Untersucht werden soll hier, ob es nach Applikation der transfizierten GC-4spc Zellen, die ein oder mehrere der entsprechenden differentiell exprimierten Gene überexprimieren, zu einer Tumorbildung kommt. Bei den „loss of function“-Experimenten soll die Expression von einigen aus-

gewählten, differentiell exprimierten Genen gezielt in der GC-1spg Zelllinie herunterreguliert werden. Dazu sollen zunächst stabile Transfektanten generiert werden, die mit Antisense-Konstrukten für die entsprechenden Gene transfiziert werden. Anschließend sollen die transfizierten GC-1spg Zellen bezüglich ihrer Proliferation und Invasion analysiert und mit nicht-transfizierten GC-1spg Zellen verglichen werden. Überdies sollen auch die mit Antisense-Konstrukten transfizierten GC-1spg Zellen in SCID Mäuse injiziert und auf eine mögliche veränderte Tumorgenese hin untersucht werden. Um zu überprüfen, ob die isolierten und in den GC-1spg Zellen überexprimierten Gene auch als Kandidatengene für Testistumoren gelten, werden diese Klone an testikulärer RNA von Patienten mit Testistumoren untersucht.

### **7.3 Weiterführende funktionelle Untersuchungen zu NIF3L1**

Von den unbekanntem und in der GC-1spg Zelllinie überexprimierten Genen wurde in der vorliegenden Arbeit das Nif311-Gen (Klon 45) analysiert und charakterisiert. Die Tatsache, dass das Nif311-Gen sowohl in der GC-1spg- als auch in der Teratokarzinomzelllinie F9 überexprimiert ist, suggeriert, dass es auch in humanen Testistumoren überexprimiert ist. Aus diesem Grund soll in weiteren Studien das Expressionsmuster von NIF3L1 bei Patienten mit Testistumoren untersucht werden. Um weitere Hinweise über die zelluläre Funktion von Nif311 zu bekommen, sollen auch hier die bereits erwähnten „gain of function“- und „loss of function“-Experimente durchgeführt werden (s. Abschnitt IV.7.2). Für eine funktionelle Analyse von Nif311 *in vivo* ist es geplant, eine Nif311- „Knock-out“-Maus zu generieren.

### **7.4 Charakterisierung von IF1 als putatives Tumorsuppressorprotein**

Das humane IF1-Gen ist auf Chromosom 3p14.1 lokalisiert. Loss-of heterozygosity-Analysen zeigten eine Deletion in dieser chromosomalen Region in zahlreichen Tumoren wie Brustkarzinomen (Bergthorsson et al., 1998), Cevixkarzinomen (Chung et al., 2000) und Nierenzellkarzinomen (Maestro et al., 2000). Das IF1-Gen gilt somit als Kandidat für ein Tumorsuppressorgen. Aufgrund der Tatsache, dass das IF1-Gen eine repetitive Triplettssequenz in der 5'-UTR in Form einer (GCC)<sub>9</sub>-Wiederholung aufweist, könnte es besonders anfällig für



eine Deletion sein (Jones et al., 2000; Auer et al., 2001). Aus diesem Grund soll über PCR-Analysen untersucht werden, ob das humane IF1-Gen in verschiedenen ausgewählten Tumoren, die eine Deletion in der o.g. chromosomalen Region zeigen, Deletionen oder andere Mutationen aufweist. Darüber hinaus soll analysiert werden, ob sich möglicherweise eine verminderte Expression von IF1 in den entsprechenden Tumorgeweben im Vergleich zu Normalgeweben ergibt, was auf eine Tumorsuppressorfunktion von IF1 hindeuten würde. In diesem Zusammenhang bieten sich quantitative RT-PCR-Analysen oder auch immunhistochemische Färbungen mit einem spezifischen Antikörper gegen IF1 an. Durch eine gezielte Überexpression des IF1-Gens in einer malignen transformierten Zelllinie wie z.B. der PC3-Zelllinie (invasive Prostatakarzinomzelllinie) (Kaighn et al., 1978) mit anschließender Applikation in SCID-Mäuse soll untersucht werden, ob sich ein vermindertes Tumorstwachstum gegenüber nicht-transfizierten Zellen ergibt. Die Generierung einer IF1 (-/-) Knockout-Maus soll zeigen, ob es bei den F1- und F2-Tieren zur Ausbildung von Tumoren kommt, was eine Tumorsuppressorfunktion von IF1 bestätigen würde.

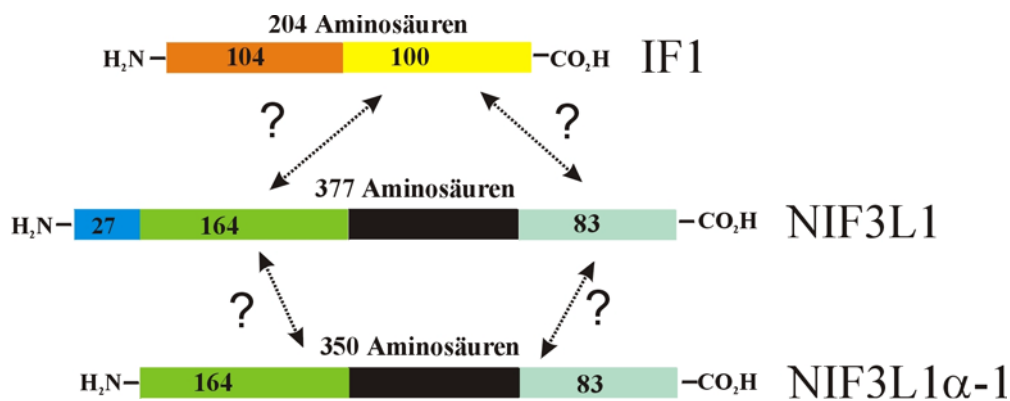
### **7.5 Weiterführende Analysen zum NIF3L1-IF1 Signaltransduktionsweg**

Der Interaktionspartner IF1 konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert werden. Da die IF1-Aminosäuresequenz keine DNA-bindende Domäne aufweist, suggeriert dies die Existenz weiterer Bindungspartner von IF1 im Nukleus. Um weitere Hinweise über die möglichen regulatorischen Funktionen des NIF3L1-IF1 Signaltransduktionsweges zu bekommen, sollen mögliche Interaktionspartner von IF1 im Nucleus über das Yeast-Two-Hybrid-System isoliert und charakterisiert werden.

### **7.6 Biochemische Charakterisierung der NIF3L1-Bindungsdomänen**

NIF3L1 besitzt zwei konservierte Domänen, die mit einer Größe von ca. 191 Aminosäuren und 83 Aminosäuren im N-Terminus bzw. im C-Terminus des Proteins lokalisiert sind (Abb. 61). Homologe Proteine von NIF3L1 finden sich durch die gesamte Evolution von einzelligen Organismen bis hinzu den Säugern. Da keine dieser beiden neuen Domänen bisher in der Literatur beschrieben wurde, sollen diese analysiert und charakterisiert werden. Dazu soll zu-

nächst festgestellt werden, welche Domäne von NIF3L1 für die Bindungen der Interaktionspartner essentiell ist. Die Verwendung von Deletionsmutanten von NIF3L1 mit anschließender Analyse im GST-Pulldown soll zeigen, über welche der beiden terminalen Domänen des Proteins die Dimerbildung oder Multimerbildung mit NIF3L1 $\alpha$ -1 erfolgt. Interessant ist natürlich auch die Frage, ob die 27 Aminosäuren am N-Terminus von NIF3L1 für eine Interaktion essentiell sind. Über das verwendete Yeast Two-Hybrid- wie auch über das verwendete Mammalian-Two-Hybrid-System konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion zwischen IF1 und NIF3L1 nur die C-terminale Region von 100 Aminosäuren essentiell ist (Abb. 61). Welche Domäne bei NIF3L1 für die Bindung mit IF1 verantwortlich ist, ist nicht bekannt. Auch hier könnten Deletionsmutanten von NIF3L1, die nur aus dem konservierten N- bzw. C-Terminus bestehen, weitere Erkenntnisse liefern.



**Abb. 61** NIF3L1 besitzt zwei Domänen, die innerhalb der Evolution sehr stark konserviert wurden. Die eine Domäne befindet sich am N-Terminus und erstreckt sich über ca. 191 Aminosäuren und ist hier blau/grün dargestellt. Die zweite konservierte Domäne befindet sich am C-Terminus und erstreckt sich über ca. 83 Aminosäuren, diese ist hier türkis dargestellt. Es ist nicht bekannt, über welche Domänen die Bindung zu NIF3L1 $\alpha$ -1 oder zu IF1 erfolgt. Außerdem bleibt festzustellen, ob die 27 Aminosäuren am N-Terminus von NIF3L1 für eine Interaktion mit den Bindungspartnern essentiell sind. Für IF1 konnte über das Yeast-Two-Hybrid-System gezeigt werden, dass eine C-terminale Region von 100 Aminosäuren ausreichend ist für eine Interaktion mit NIF3L1.

Bei der Interaktion zwischen NIF3L1 und NIF3L1 $\alpha$ -1 handelt es sich prinzipiell entweder um eine Dimer- oder um eine Multimerbindung. Da man die genaue Konfiguration des Komplexes über das Yeast-Two-Hybrid-System nicht bestimmen kann, sollen Cross-Linking Studien

unter Verwendung eines Antikörpers gegen NIF3L1 die genaue Struktur analysieren. In diesem Zusammenhang sollen auch die zahlreichen putativen Phosphorylierungsstellen für die Protein Kinase C oder die Casein Kinase II näher charakterisiert werden. Insbesondere soll untersucht werden, ob eine Phosphorylierung von NIF3L1 einen möglichen verstärkenden oder inhibierenden Einfluss auf die Konformation des NIF3L1-NIF3L1 $\alpha$ -1 Komplexes oder auf die Interaktion mit IF1 hat. Dazu soll zunächst untersucht werden, welche Aminosäuren phosphoryliert werden. Phosphorylierungsstudien mit radioaktiv markiertem  $^{32}\text{P}$  und anschließender chromatografischer Analyse des Proteins und Edman-Sequenzierung sollen dies klären. Im nächsten Schritt ist geplant, die identifizierten Phosphorylierungsstellen gezielt zu mutieren, um anschließend erneut cross-linking-Studien durchzuführen. Untersucht werden soll somit, ob sich dadurch eine Konformationsänderung des NIF3L1-NIF3L1 $\alpha$ -1-Komplexes ergibt, z.B. vom Multimer zum Dimer und ob dadurch die Interaktion mit IF1 beeinflusst wird.

## V. Resümee

In der vorliegenden Arbeit wurde die Suszeptibilität der Spermatogonien und Spermatozyten zur malignen Transformation über einen experimentellen *in vivo*- und über einen experimentellen *in vitro* Ansatz evaluiert. Ziel des *in vivo* Ansatzes war es zu untersuchen, ob transgene Mäuse über eine zielgerichtete und stadienspezifische Expression eines viralen Onkogens in den Spermatozyten bzw. Spermatogonien maligne transformiert werden können. Als virales Onkogen wurde das SV40 large T Antigen (LTA) verwendet.

Die stadienspezifische Expression des LTA in den Spermatozyten erfolgte unter der Kontrolle des humanen Phosphoglycerat-Kinase 2 (PGK2)-Promotors. Die generierten PGK2-LTA transgenen Mäuse zeigten eine testisspezifische Expression des large T Antigens ab dem postnatalen 12. Tag der testikulären Entwicklung, also im Stadium der Präleptotänspermatozyten. Auch nach 20 Monaten zeigten die PGK2-LTA transgenen Mäuse keine Tumorentwicklung im Testis oder in anderen Organen. Präpubertäre PGK2-LTA transgene Mäuse zeigten eine abnorme Keimzellproliferation, die sich in einer signifikanten und transienten Erhöhung der Anzahl an Spermatozyten manifestierte. In späteren Altersstadien assimilierte sich die erhöhte Anzahl der Spermatozyten in den transgenen Mäusen an die Anzahl in den Wildtypmäusen über Apoptose. Die Analyse der PGK2-LTA transgenen Mäuse demonstriert, dass Spermatozyten nicht die Potenz zur malignen Transformation aufweisen.

Um das LTA stadienspezifisch in den Spermatogonien zu exprimieren, wurde der humane TSPY (testis-specific protein, Y-encoded)-Promotor als 5'-regulierende Sequenz verwendet. Insgesamt konnten zwei Linien (Linie 23 u. Linie 61) etabliert werden, die eine Expression von LTA im Testis aufweisen. Expressionsanalysen mit RNAs aus verschiedenen Geweben zeigten neben der Expression im Testis auch eine Expression in der Milz. Beim Founder 57 sowie bei mehreren Tieren in der Linie 23 traten im Alter von 3-4 Monaten Tumoren in der Sella turcica auf. Dabei handelt es sich vermutlich um Hypophysentumoren. Gegenwärtig werden diese Tumoren auf die Expression spezifischer Markergene analysiert, um die genaue Spezifität des Tumors zu determinieren. Die Analyse der TSPY-LTA transgenen Mäuse ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

Ziel des *in vitro* Ansatzes war es mit Hilfe von immortalisierten Keimzelllinien die Potenz der Spermatozyten und der Spermatogonien zur malignen Transformation zu evaluieren. Die immortalisierte Spermatogonienzelllinie GC-1spg und die immortalisierte Spermatozytenzelllinie GC-4spc sollten auf der Ebene des Phänotyps sowie auf der Ebene der Expression miteinander verglichen werden.

Zunächst wurde eine neue Spermatozytenzelllinie GC-4spc der Maus unter Verwendung des Promotor-basierten Selektionsverfahrens hergestellt. Die etablierte GC-4spc Zelllinie wächst adhärent und wurde bereits für mehr als 30 Generationen kultiviert. Außerdem weist die Zelllinie einen diploiden DNA-Gehalt auf, womit ausgeschlossen ist, dass die Zellen *in vitro* weiter in haploide Spermatiden differenzieren. Die GC-4spc Zelllinie wurde auf ihre Stadienspezifität evaluiert. Dabei konnte eine Expression des Pkg2-Gens, des Proakrosin-Gens und des Amyb-Gens nachgewiesen werden. Bei der Maus werden diese Gene keimzellspezifisch exprimiert, darüber hinaus sind das Pkg2-Gen und das Proakrosin-Gen spezifische Expressionsmarker für Spermatozyten. Überdies zeigte eine 1.4 kb lange 5'-flankierende Sequenz des humanen PGK2-Gens eine erhöhte transkriptionelle Aktivität in der GC-4spc Zelllinie. Expressionsanalysen von Markergenen für andere Zelltypen im Testis wie Peritubular-Zellen, Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen oder Makrophagen waren negativ. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde die GC-4spc Zelllinie einem Differenzierungsstadium zwischen den Präleptotänspermatozyten und den frühen Pachytänspermatozyten zugeordnet.

Im folgenden wurde die GC-1spg- mit der GC-4spc Zelllinie auf der Ebene des Phänotyps sowie auf der Ebene der Expression miteinander verglichen. Die Spermatogonienzelllinie GC-1spg wurde von Hofmann et al. (1992) hergestellt und repräsentiert ein Differenzierungsstadium zwischen den Spermatogonien des Typs B und den Präleptotänspermatozyten. Die GC-1spg Zellen wurden mit dem SV40 large T Antigen immortalisiert. Es zeigte sich, dass die GC-1spg Zelllinie im Vergleich zur GC-4spc Zelllinie stärker proliferiert und ein deutlich erhöhtes Invasionspotential besitzt. Ferner wurde eine Überexpression des Tumormarkers GCAP bzw. seines Maus-homologen EAP in der GC-1spg Zelllinie festgestellt. In einem Pilotexperiment wurde demonstriert, dass nach subkutaner und intratestikulärer Applikation der GC-1spg Zellen in SCID-Mäuse Tumoren entstehen, wohingegen es nach subkutaner und intratestikulärer Applikation der GC-4spc Zellen in SCID-Mäuse zu keiner Tumorbildung kommt. Die durchgeführten Studien zeigen eindeutig, dass es sich bei der Spermatogonienzel-

linie GC-1spg im Vergleich zur Spermatozytenzelllinie GC-4spc um eine maligne transformierte Zelllinie handelt. Aus diesem Grund wurden über die Methode der subtraktiven Hybridisierung Gene isoliert, die in der GC-1spg Zelllinie überexprimiert sind und somit potentiell für den malignen Phänotyp der Zelllinie verantwortlich sind. Insgesamt konnten 8 bekannte und 4 unbekannte cDNA Klone isoliert werden, die in der GC-1spg Zelllinie differentiell exprimiert werden. Diese gelten als Kandidatengene für den malignen Phänotyp der GC-1spg Zellen. Über den experimentellen *in vitro* Ansatz konnte gezeigt werden, dass Spermatozyten keine Suszeptibilität zur malignen Transformation besitzen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den *in vivo* Ergebnissen der PGK2-LTA transgenen Mäuse. Zum anderen konnte demonstriert werden, dass Spermatogonien *in vitro* die Potenz zur malignen Transformation besitzen.

Um unbekannte, in der GC-1spg Zelllinie überexprimierte cDNA-Klone zu charakterisieren und mit dem malignen Phänotyp der GC-1spg Zellen in Verbindung zu bringen, wurde der Klon 45 analysiert und charakterisiert. Die „full-length“ cDNA der Maus und des Menschen wurden isoliert, und es zeigte sich eine hohe Homologie zum „Ngg1-interacting factor3“ der Hefe, woraufhin die isolierte cDNA der Maus fortan mit Nif311 („Ngg1 interacting factor3 like1“) und die homologe humane „full-length“ cDNA-Sequenz analog mit NIF3L1 bezeichnet wurde. Nif311 zeigt ein ubiquitäres Expressionsmuster in sämtlichen analysierten Geweben der Maus sowie eine Expression durch die gesamte embryonale Entwicklung. Desweiteren zeigt das Nif311-Gen eine starke Überexpression in der GC-1spg – sowie in der Teratokarzinomzelllinie F9. Das Nif311-Gen der Maus wurde auf Chromosom 1, Region C lokalisiert. Das homologe humane NIF3L1-Gen konnte auf Chromosom 2q33 lokalisiert werden und besteht aus sieben Exons, die eine genomische Sequenz von ca. 14 kb umspannen. Über ein GFP-NIF3L1-Fusionsprotein erfolgte die zelluläre Lokalisation von NIF3L1 im Zytoplasma. Es zeigte sich, dass die Aminosäuresequenz von NIF3L1 in den beiden flankierenden Regionen zwei Domänen besitzt, die innerhalb der Evolution konserviert wurden. Homologe Proteine finden sich von den Archaeobakterien bis hin zu den Säugern.

Über das Yeast-Two-Hybrid-System wurden zwei Interaktionspartner von NIF3L1 isoliert. Dabei handelt es sich zum einen um NIF3L1 $\alpha$ -1, eine Spleißvariante von NIF3L1, die für ein trunkiertes Protein von 350 Aminosäuren kodiert. Zum anderen handelt es sich um ein 204 Aminosäuren großes Protein, das mit IF1 (Interacting factor 1) bezeichnet wurde. Die im

Yeast-Two-Hybrid gefundenen Interaktionen wurden im GST-Pulldown bzw. im Mammalian-Two-Hybrid-System verifiziert. Das humane IF1-Gen wurde auf Chromosom 3p14.1 lokalisiert und besteht aus 8 Exons, die eine genomische Sequenz von ungefähr 30 kb umspannen. Im weiteren Verlauf wurde die homologe If1-cDNA der Maus isoliert. Expressionsanalysen mit RNAs aus verschiedenen Geweben der Maus zeigten eine ubiquitäre Expression von If1 sowie eine Expression von If1 durch die gesamte Embryonalentwicklung. Über ein GFP-IF1 Fusionsprotein wurde die zelluläre Lokalisation von IF1 sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma bestimmt.

## VI. Literaturverzeichnis

Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinmann, H. K., Martin, G. R., Aronson, S. A., Kozlowski, J. M. and McEwan, R. N. (1987). A rapid in vitro assay for quantifying the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.*, 47: 3239-3245.

Allemand, I., Grimber, G., Kornprobst, M., Bennoun M., Molina T., Briand P. and Joulin V. (1995). Compensatory apoptosis in response to SV40 large T antigen expression in liver. *Oncogene*, 11: 2583-2590.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.

Amano, T., Richelson, E. and Nirenberg M. (1972). Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 258:263.

Arenas, M. I., Romo, E., Royuela, M., Fraile, B. and Paniagua, R. (2000). E-, N- and P-cadherin, and alpha-, beta- and gamma-catenin protein expression in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *Histochem. J.*, 32: 659-67.

Arnemann, J., Epplen, J. T., Cooke, H. J., Sauermann, U., Engel, W. and Schmidtke, J. (1991). A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleic Acids Res.*, 15: 8713-8724.

Auer, R. L. A., Jones, C., Mullenbach, R. A., Syndercombe-Court, D., Milligan, D. W., Fegan, C. D. and Cotter, F. E. (2001). Role for CCG-trinucleotide repeats in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 97: 509-515.

Ausubel, F. M. (1992). *Current protocols in molecular biology*. Wiley & Sons Inc, New York, USA.



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

Bates, S. and Vousden, K. H. (1999). Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.*, 55: 28-37.

Begum, N. A., Mori, M., Matsumata, T., Takenaka, K., Sugimachi, K. and Barnard, G. F. (1995). Differential display and integrin alpha 6 messenger RNA overexpression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 22: 1447-1455.

Behringer, R. R., Hammer, R. R., Brinster, R. L., Palmiter, R. D. and Townes, T. M. (1987). Two 3' sequences direct adult erythroid-specific expression of human  $\beta$ -globin genes in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7056-7060.

Behringer, R. R., Peschon, J. J., Messing, A., Gartside, C. L., Hauschka, S. D., Palmiter, R. D. and Brinster R. L. (1988). Heart and bone tumors in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2648-2652.

Bergthorsson, J. T., Johannsdottir, A., Johannsdottir, J., Eiriksdottir, G., Egilsson, V., Ingvarsson, S., Barkardottir, R. B. and Arason, A. (1998). Chromosome imbalance at the 3p14 region in human breast tumours: high frequency in patients with inherited predisposition due to BRCA2. *Eur. J. Cancer*, 34:142-147.

Blagosklonny, M. V. (1999). A node between proliferation, apoptosis, and growth arrest. *Bioessays*, 21: 704-709.

Botteri, F. M., Van der Putten, H., Wong, D. F., Sauvage, C. A. and Evans, E. M. (1987). Unexpected thymic hyperplasia in transgenic mice harboring a neuronal promoter fused with simian virus 40 large T antigen. *Mol. Cell Biol.*, 7: 3178-3184.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Brandl, J. C., Furlanetto, A. M., Martens, J. A. and Hamilton, K. S. (1993). Characterization of Ngg1, a novel yeast gene required for glucose repression of GAL4p-regulated transcription. *EMBO, J.*, 12 : 5255-5265.

Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Yagle, M. K. and Palmiter, R. D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4438-4442.

Chagani, R. S. K., Rodriguez, E. and Bosl, G. J. (1993). Cytogenetics of male germ-cell tumors. *Urol. Clin. North Am.*, 20: 55-66.

Chaganti, R. S. K. and Houldsworth, J. (2000). Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res.*, 60: 1475-148.

Chang, K. S., Wang, G., Freireich, E. J., Daly, M., Naylor, S. L., Trujillo S. M. and Stass S. A. (1992). Specific expression of annexin VIII gene in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 79: 1802-1810.

Chen, S. L., Tsao, Y. P., Chen, Y. L., Huang, S. J., Chang, J. L. and Wu, S. F. (1998). The induction of apoptosis by SV40 T antigen correlates with c-jun overexpression. *Virology*, 244: 521-529.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162: 156-159.

Chung, T. K., Cheung, T.H., Lo, W. K., Yu, M. Y., Hampton, G. M., Wong, H. K. and Wong, Y. F. (2000). Loss of heterozygosity at the short arm of chromosome 3 in microdissected cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Lett.*, 154: 189-194.

Cooke, P. S., Zhao, Y. D. and Bunick, D. (1994). Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells, possible mechanisms for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol. Reprod.*, 51, 1000-1005.

Cross, M., Mangelsdorf, I., Wedel, A. and Renkawitz R. (1988). Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization and expression studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:6232-6236.

Dagert, M. and Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, 6: 23-28.

De Caprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E. and Livingston, D. M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54 : 275-83.

De Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. and Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, 13: 1-8.

Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A.P., Chechik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. and Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6025-6030.

Djakiew, D. and Dym, M. (1998). Pachytene spermatocyte proteins influence Sertoli cell function. *Biol. Reprod.*, 39: 1193-1205.

Dupressoir, A. and Heidemann, T. (1997). Expression of intracisternal A-particle retrotransposons in primary tumors of oncogene-expressing transgenic mice. *Oncogene*, 14: 2951-2958.

Einhorn, L. H. (1990). Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *J. Clin. Oncol.*, 8: 1777-1781.

Ewen, M. E., Xing, Y. G., Lawrence, J. B. and Livingston, D. M. (1991). Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell*, 66: 1155-1164.

Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments of high specific activity. *Anal. Biochem.*, 137: 266-267.

Feng, Y., Zhang, F., Lokey, L. K., Chastain, J. L., Lakkis, L., Eberhart, D. and Warren, S. T. (1995). Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science*, 268: 731-4.

Fields, S. and Song, Q. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245-247.

Forman, D., Oliver, D. T., Brett, A. R., Marsh, S. G., Moses, J. H., Bodmer, J. G., Chilvers, C. E. and Pike, M. C. (1992). Familial testicular cancer: a report of the UK family register, estimation of risk and an HLA class I sib-pair analysis. *Br. J. Cancer*, 65: 255-262.

Fujisawa, M., Tatsumi, N., Fujioka, H., Kanzaki, M., Okuda, Y., Arakawa, S. and Kamidono, S. (2000). Nitric oxide production of rat Leydig and Sertoli cells is stimulated by round spermatid factor(s). *Mol. Cell Endocrinol.*, 160: 99-105.

Galjart, N. J., Gillemans, N., Meijer, D. and D'azzo, A. (1990). Mouse protective protein. cDNA cloning, sequence comparison, and expression. *J. Biol. Chem.*, 265: 4678-4684.

Gey, G. O., Coffmann, W. D. and Kubicek, M. T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12: 264.

Graber, M. W., Schweinfest, C. W., Reed, C. E., Papas, T. S. and Baron, P. L. (1996). Isolation of differentially expressed genes in carcinoma of the esophagus. *Ann. Surg. Oncol.*, 3: 192-197.

Grassi, M., Girault, J. M., Wang, W. P., Thiery, J. P. and Jouanneau, J. (1999). Metastatic rat carcinoma cells express a new retrotransposon. *Gene*, 233: 59-66.

Grigor, K. M. and Wylie, C. C. (1998). The origin and biology of CIS cells: General discussion. *APMIS*, 106: 221-224.

Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Sem. Cell Dev. Biol.*, 9: 411-416.

- Hadano, S., Yanagisawa, Y., Skaug, J., Fichter, K., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B. F., Scherer, S. W., Nicholson, D. W., Rouleau, G. A., Ikeda, J. and Hayden, M. R. (2001). Cloning and characterization of three novel genes, ALS2CR1, ALS2CR2 and ALS2CR3, in the juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS2) critical region at chromosome 2q33-q34: Candidate genes for ALS2. *Genomics*, 71: 200-213.
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*, 315: 115-22.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: DNA cloning, a practical approach. GLOVER, D.M. (Hrsg.), IRL Press, Oxford-Washington D.C.
- Hanes, J., Freudenstein, J., Rapp, G. and Scheit, K. H. (1992). Construction of a plasmid containing the complete coding region of human elongation factor-2. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 373: 201-204.
- Hecht, N. B. (1998). Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays*, 20: 555-61.
- Hellstrom, I., Beaumier, P. L. and Hellstrom, K. E. (1986). Antitumor effects of L6, an IgG2a antibody that reacts with most human carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7059-7063.
- Hentati, A., Bejaoui, K., Pericak-Vance, M. A., Hentati, F., Speer, M. C., Hung, W. Y., Figlewicz, D. A., Haines, J., Rimmler, J. and Ben Hamida, C. (1994). Linkage of recessive familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 2q33-q35. *Nat. Genet.*, 7: 425-428.
- Hiramoto, S., Tamba, M., Kiuchi, S., Jin, Y., Bannai, S., Sugita, Y., Dacheux, F., Dacheux, J., Yoshida, M. and Okamura, N. (1997). Stage-specific expression of a mouse homologue of the porcine 135 kDa  $\alpha$ -D-Mannosidase (MAN2B2) in type A spermatogonia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241: 439-445.

Hofmann, M. C., Jeltsch, W., Brescher, J. and Walt, H. (1989). Alkaline phosphatase isoenzymes in human testicular germ cell tumors, three related cell lines and their precancerous stage. *Cancer Res.*, 49: 4696-4700.

Hofmann, M. C., Narisawa, S., Hess, R. A. and Millan, J. L. (1992). immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen. *Exp. Cell Res.*, 201: 417-435.

Hofmann, M. C. and Millan, J. L. (1993). Developmental expression of alkaline phosphatase genes; reexpression in germ cell tumours and in vitro immortalized germ cells. *Eur. Urol.*, 23: 38-45.

Hofmann, M. C., Hess, R. A., Goldberg, E. and Millan, J. L. (1994). Immortalized germ cells undergo meiosis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5533-5537.

Hogan, B., Constantini, F. and Lacy, E. (1994). In manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor New York.

Houldsworth, J., Reuter, V., Bosl, G. J. and Chaganti, R. S. K. (1997). Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ.*, 8: 293-299.

Husmarck, J., Heldin, N. E. and Nilsson, M. (1999). N-cadherin-mediated adhesion and aberrant catenin expression in anaplastic thyroid-carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer*, 83: 692-699.

Idzerda, R. L., Behringer, R. R., Theisen, M., Huggenvik, J., McKnight, G. S. and Brinster, R. L. (1989). Expression from the transferrin gene promoter in transgenic mice. *Mol. Cell Biol.*, 9: 5154-5162.

Jones, C., Müllenbach, R., Grossfeld, P., Auer, R., Favier, R., Chien, K., James, M., Tunnicliffe, A. and Cotter, F. (2000). Co-localisation of CCG repeats and chromosome deletion breakpoints in Jacobsen syndrome: evidence for a common mechanism of chromosome breakage. *Hum. Mol. Gen.*, 9: 1201-1208.

Jonsson, C. K. (1999). Constitutive expression of Interleukin-1alpha messenger ribonucleic acid in rat Sertoli cells is dependent upon interaction with germ cells. *Endocrinology*, 140: 3755-3761.

Kaighn, M. E., Lechner, J. F., Narayan, K. S. and Jones, L. W. (1978). Prostate carcinoma: tissue culture cell lines. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 49:17-21.

Kleene, K. C. and Flynn, J. F. (1987). Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse. *J. Biol. Chem.*, 262: 17272-17277.

Kleiderlein, J. J., Nisson, P. E., Jesse, J., Li, W. B. L., Becker, G. K., Derby, M. L., Ross, C. A. and Margolis, R. L. (1998). CCG repeats in cDNAs from human brain. *Hum. Genet.*, 103: 666-673.

Koehler, M. R., Bosserhof, A. K., von Beust, G., Bauer, A., Blesch, A., Buettner, R., Schlegel, J., Bogdahn, U. and Schmid, M. (1996). Assignment of the human melanoma inhibitory activity gene (MIA) to 19q13.32-33 by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genomics*, 35: 265-267.

Kogan, S. C., Doherty, M. and Gitschier, J. (1987). An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *New England J. Med.*, 317: 985-990.

Koike, K., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie H., Tsutsumi, T. and Kimura S. (1998). Compensatory apoptosis in preneoplastic liver of a transgenic mouse model for viral hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.*, 134: 181-186.

Kraszucka, K., Burfeind, P., Nayernia, K., Köhler, M., Schmid, M., Yaylaoglu, M. and Engel, W. (1999). Developmental stage- and germ cell-regulated expression of a calcium-binding protein mRNA in mouse Sertoli cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 54: 232-243.

Laird, P. W., Zijderwald, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R. and Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.*, 19: 4293.

Lambert, H., Charette, S. T., Bernier, A. F., Guimond, A. and Landry, J. (1999). HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J. Biol. Chem.*, 274: 9378-9385.

Latham, K. E., Litvin, J., Orth, J. M., Patel, B., Mettus, R. and Reddy, E. P. (1996). Temporal patterns of A-myb and B-myb gene expression during testis development. *Oncogene*, 13: 1161-1168.

Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, S., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P. and Zeviani, M. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80: 155-160.

Lentsch, A. B. and Ward, P. A. (1999). Activation and regulation of NFkappaB during acute inflammation. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37: 205-208.

Li, T., Narhi, L. O., Wen, J., Philo, J. S., Sitney, K., Inoue, J., Yamamoto, T. and Arakawa, T. (1998). Interactions between NFkappaB and its inhibitor IkappaB: biophysical characterization of a NFkappaB/IkappaB-alpha complex. *J. Protein. Chem.*, 17: 757-763.

Liu, J. H., Stass, S. A. and Chang, K. S. (1994). Expression of the annexin VIII gene in acute promyelocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 13: 381-386.

Liu, Q., Fischer, U., Wang, F. and Dreyfuss, G. (1997). The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*, 9: 1013-1021.

Livingston, D. M. and Bradley, M. K. (1987). The Simian Virus 40 large T- antigen. A lot packed into a tittle. *Mol. Biol. Med.*, 4: 63-68.



Maestro, M. L., Del Barco, V., Sanz-Casla, M. T., Moreno, J., Adrover, E., Izquierdo, L., Zanna, I., Fernandez, C., Redondo, E., Blanco, J. and Resel, L. (2000). Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in renal cancer. *Oncology*, 59: 126-130.

Marken, J. S., Schieven, G. L., Hellstroem, I., Hellstroem, K. E. and Aruffo, A. (1992). Cloning and expression of the tumor-associated antigen L6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3503-3507.

Martens, J. A., Generaux, J., Saleh, A. and Brandl, C. J. (1996). Transcriptional activation by yeast PDR1p is inhibited by its association with Ngg1/ ADA3p. *J. Biol. Chem.*, 271:15884-15890.

Mattaj, I. W. and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:265-306.

Mazeyrat, S. and Mitchell, M. J. (1998). Rodent Y chromosome TSPY gene is functional in rat and non-functional in mouse. *Hum. Mol. Genet.*, 7: 557-562.

McCarrey, J. R., Berg, W. M., Paragioudakis, S. J., Zhang, P. L., Dilworth, D. D., Arnold, B. L. and Rossi, J. J. (1992). Differential transcription of P<sub>gk</sub> genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev. Biol.*, 154: 160-168.

McCarrey, J. R., Kumari, M., Aivaliotis, M. J., Wang, Z., Zhang, P., Marshall, F. and Vandenberg, J. L. (1996). Analysis of the cDNA and encoded protein of the human testis-specific PGK2 gene. *Dev. Genet.*, 19: 321-332.

McInnis, M. G. (1996). Anticipation: an old idea in new genes. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 973-979.

Meinhardt, A., Renneberg, H., Dersch, A., Wennemuth, G., Millan, J. L., Aumüller, G. and Seitz, J. (1997). The immortalized mouse germ cell line GC-1spg as a model for mitochondrial differentiation during meiosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 424: 61-63.

Naik, P., Karrim, J. and Hanahan, D. (1996). The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis: down-modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitors. *Genes Dev.*, 10: 2105-2116.

Narisawa, S., Hofmann, M. C., Ziomek, C. A. and Millan, J. L. (1992). Embryonic alkaline phosphatase is expressed at M-phase in spermatogenic lineage of the mouse. *Development*, 116: 159-165.

Nayernia, K., Nieter, S., Kremling, H., Oberwinkler, H. and Engel, W. (1994). Functional and molecular characterization of the transcriptional regulatory region of the proacrosin gene. *J. Biol. Chem.*, 269: 32181-32186.

Nayernia, K., Abbas, A., Klapproth, S. and Engel, W. (1998). Haploid male germ cells show no susceptibility to transformation by simian virus large tumor antigen in transgenic mice. *Cell Biol. Int.*, 22: 437-43.

Nayernia, K., von Mehring, M. H. P., Kraszucka, K., Burfeind, P., Wehrend, A., Köhler, M., Schmid, M. and Engel, W. (1999). A novel testicular haploid expressed gene (THEG) involved in mouse spermatid-Sertoli cell interaction. *Biol. Reprod.*, 60: 1488-1495.

Nomura, T., Sakai, N., Sarai, A., Sudo, T., Kanei-Ishii, C., Ramsay, R. G., Favier, D., Gonda, T. J. and Ishii, S. (1993). Negative autoregulation of c-Myb activity by homodimer formation through the leucine zipper. *J. Biol. Chem.*, 268: 21914-23.

Okuyama, R., Yanai, N. and Obinata, M. (1995). Differentiation capacity toward mesenchymal cell lineages of bone marrow stromal cells established from temperature-sensitive SV40 T-antigen gene transgenic mouse. *Exp. Cell Res.*, 218: 424-9.

Orth, J. M., Gunsalus, G. L. and Lamperti, A. A. (1998). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122: 787-794.

Oyen, O., Myklebust, F., Scott, J. D., Cadd, G. G., McKnight, G. S., Hansson, V. and Jahn-  
sen, T. (1990). Subunits of cAMP protein kinase show differential and distinct expression pat-  
terns during germ cell line differentiation: alternative polyadenylation in germ cells gives rise  
to unique smaller-sized mRNA species. *Biol. Reprod.*, 43: 46-54.

Pellizzoni, L., Charroux, B. and Dreyfuss, G. (1999). SMN mutants of spinal muscular atro-  
phy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:  
11167-11172.

Pinkel, D., Straume, T. and Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-  
sensitivity, fluorescence hybridisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2934-2938.

Porsch, P., Merkelbach, S., Gehlen, J. and Fladung, M. (1993). The nonradioactive chloram-  
phenicol acetyltransferase-enzyme –linked immunoabsorbent assay test is suited for promoter  
activity studies in plant protoplasts. *Anal. Biochem.*, 211: 113-116.

Print, C. G. and Loveland, K. L. (2000). Germ cell suicide: new insights into apoptosis during  
spermatogenesis. *Bioessays*, 22: 423-430.

Rabinovitz, I., Nagle, R. B. and Cress, A. E. (1995). Integrin alpha 6 expression in human  
prostate carcinoma cells is associated with a migratory and invasive phenotype in vitro and in  
vivo. *Clin. Exp. Metastasis*, 13: 481-491.

Rapley, E. A., Crockford, G. P., Teare, T., et al. (2000). Localization to Xq27 of a susceptibil-  
ity gene for testicular germ-cell tumours. *Nat. Genet.*, 24: 197-200.

Rieger, L. (2001). Charakterisierung von Interaktionspartnern von SALL1. Diplomarbeit, U-  
niversität Göttingen.

Robinson, M. O., McCarrey, J. R. and Simon, M. I. (1989). Transcriptional regulatory regions  
of testis-specific PGK2 defined in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8437-  
8441.

Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I. and Vassalli, P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.*, 16: 2262-2270.

Romrell, L. J., Bellve, A. R. and Fawcett, D. W. (1976). Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Dev. Biol.*, 49: 119-131.

Ross, C. A., Margolis, R. L., Becher, M. W., Wood, J. D., Engelender, S. and Sharp, A. H. (1998). Pathogenesis of polyglutamine neurodegenerative diseases: towards a unifying mechanism. In: Wells, R. D., Warren, S. T. (eds) *Genetic instabilities and hereditary neurological diseases*. Academic Press, San Diego, pp 761-776.

Russel, L. D., Ettlin, R. A. and Hikim, A. P. S. (1990). *Histological and histopathological evaluation of the Testes*. Clearwater, Florida: Cache River Press.

Sadowski, I., Bell, B., Broad, P. and Hollis, M. (1992). GAL4 fusion vectors for expressions in yeast or mammalian cells. *Gene*, 118: 137-141.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloon, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). In *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanborn, B. M., Millan, J. L., Meistrich, M. L. and Moore, L. C. (1997). Alternative splicing of CREB and CREM mRNAs in an immortalized germ cell line. *J. Androl.*, 18: 62-70.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.

Sarkar, A., Yang, P., Fan, Y. H., Mu, Z. M., Hauptmann, R., Adolf, G. R., Stass, S. A. and Chang, K. S. (1994). Regulation of the expression of annexin VIII in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 84: 279-286.

Schnieders, F., Dörk, T., Arnemann, J., Vogel, T., Werner, M. and Schmidtke, J. (1996). Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Hum. Mol. Genet.*, 5: 1801-1807.

Schottenfeld, D. and Warshuer, M. E. (1982). Testis. In: D. Schottenfeld and J.F. Fraumeni. *Cancer Epidemiology and Prevention*. pp. 947-957. London: W. B. Saunders Co.

Schuermann, M. (1990). An expression vector system for stable expression of oncogenes. *Nucleic Acids Res.*, 18: 4945-4946.

Schuler, G. D. (1998). Electronic PCR: bridging the gap between genome mapping and genome sequencing. *Trends Biotechnol.*, 16: 456-459.

Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S. and Ulevitch, R. J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, 249: 1429-1431.

Schwartz, D., Goldfinger, N., Kam, Z. and Rotter, V. (1999). p53 controls low DNA damage-dependent premeiotic checkpoint and facilitates DNA repair during spermatogenesis. *Cell Growth Differ.*, 10: 665-675.

Seydel, K. B. and Stanley, S. L. (1996). SCID mice and study of parasitic disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9: 126-134.

Sheets, M. D., Ogg, S. C. and Wickens, M. P. (1990). Point mutation in AAUAAA and the poly(A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res.*, 19: 539-545.

Sherman, M. I., Strickland, S. and Reich, E. (1976). Differentiation of early mouse embryonic

and teratocarcinoma cells in vitro: plasminogen activator production. *Cancer Res.*, 36 : 4208-4216

Shibata, M. A., Liu, M. L., Knudson, M. C., Shibata, E., Yoshidome, K., Bandey, T., Korsmeyer, J. and Green J. E. (1999). Haploid loss of bax leads to accelerated mammary tumor development in C3(1)/SV40-TAg transgenic mice: reduction in protective apoptotic response at the preneoplastic stage. *EMBO J.*, 18: 2692-2701.

Siddique, T., Nijhawan, D. and Hentati, A. (1996). Molecular genetic basis of familiar ALS. *Neurology*, 47: 27-35.

Skakkebaek, N. (1972). Possible carcinoma in situ in the testis. *Lancet*, 2: 516-517.

Skakkebaek, N., Berthelsen, J., Giwercman, A. and Muller, J. (1987). Carcinoma in situ of the testis and possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int. J. Andr.*, 10: 19-28.

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

Soler, A. P., Johnson, K. R., Wheelock, M. J. and Knudsen, K. A. (1993). Rhabdomyosarcoma-derived cell lines exhibit aberrant expression of the cell-cell adhesion molecules N-CAM, N-cadherin, and cadherin-associated proteins. *Exp. Cell Res.*, 208: 84-93.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.

Stilgenbauer, S., Liebisch, P. and James, M. R. (1996). Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-23.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11837-11841.

Strachnan, T. und Read, A. P. (1996). *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

Suzuki, Y., Fukuoka, K., Sakuraba, H., Hayashi, K. and Ko, Y. M. (1982). Galactosialidosis (beta-galactosidase-neuraminidase deficiency): clinical and biochemical studies on 13 patients. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 152: 241-51.

Swanson, L. W., Simmons, D. D., Arriza, J., Hammer, R., Brinster, R., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M. (1985). Novel development specificity in the nervous system of transgenic animals expressing growth hormone fusion genes. *Nature*, 317: 363-366.

Tascou, S., Nayernia, K., Samani, A., Schmidtke, J., Vogel, T., Engel, W. and Burfeind, P. (2000). Immortalization of murine male germ cells at a discrete stage of differentiation by a novel promoter-based selection strategy. *Biol. Reprod.*, 63: 1555-1561.

Tascou, S., Nayernia, K., Engel, W. and Burfeind, P. (2000). Refinement of the expression pattern of a mouse homologue of the porcine 135-kDa-  $\alpha$ -D-Mannosidase (MAN2B2). *Biochem. Biophys. Res. Communic.*, 272: 951-952.

Tascou, S., Uedelhoven, J., Dixkens, C., Nayernia, K., Engel, W. and Burfeind, P. (2000). Isolation and characterization of a novel human gene, NIF3L1, and its mouse ortholog, Nif3l1; Highly conserved from bacteria to mammals. *Cytogenet. Cell Genet.*, 90: 330-336.

Tascou, S., Nayernia, K., Uedelhoven, J., Böhm, D., Jalal, R., Ahmed, M., Engel, W. and Burfeind, P. (2001). Isolation and characterization of differentially expressed genes in invasive and non-invasive immortalized murine male germ cells in vitro. *Int. J. Oncol.*, 18: 567-574.

Timmer, A., Osterhuis, J. W., Schraffordt, H., Sleijfer, D. T., Szabo, B. G. and Timmens, W. (1994). The tumor microenvironment: possible role of integrins and the extracellular matrix in tumor biological behavior of intratubular germ cell neoplasia and testicular seminomas. *Am. J. Pathol.*, 144: 1035-1044.

Tollerud, D. J., Blattner, W. A., Fraser, M. C., Brown, L. M., Pottern, L., Shapiro, E., Kirkemo, A., Shawker, T. H., Javadpour, N. and O'Connell, K. (1985). Familial testicular cancer and urogenital developmental abnormalities. *Cancer*, 55: 1849-1854.

Tsai, S., Pasumarthi, K. B. S., Pajak, L., Franklin, M., Patton, B., Wang, H., Henzel, W. J., Stults, J. T. and Field, L. J. (2000). Simian Virus 40 large T antigen binds a novel Bcl-2 homology domain 3-containing proapoptosis protein in the cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, 275: 3239-3246.

Tsan, J. T., Wang, Z. W., Hwang, L.Y., Bash, R. O. and Baer, R. (1997). Mammalian cells as hosts for two-hybrid studies of protein-protein interaction. In: Bartel, P. L. and Fiels, S. (ed): *The yeast two hybrid system*. New York, Oxford: Ox. Uni. Press., 217-232.

Tsao, Y. P., Li, S. F., Liu, J. C. and Chen S. L. (1998). Apoptosis is induced in aging SV40 T antigen-transformed human fibroblasts through p53- and p21CIP1/WAF1-independent pathways. *Cancer Lett.*, 133: 77-82.

Tsuruta, J. K. and O'Brien, D. A. (1995). Sertoli cell-spermatogenic cell interaction: the insulin-like growth factor-II/cation-independent mannose 6-phosphate receptor mediates changes in spermatogenic cell gene expression in mice. *Biol. Reprod.*, 53: 1454-1464.

Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K. K., Weelock, M. J. and Takeichi, M. (1996). The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol.*, 135: 767-779.

Ulbright, T. M. (1993). Germ cell neoplasms of the testis. *Am. J. Surg. Pathol.*, 17: 1075-1091.

Van Haaster, L. H., De Jong, F. H. and Docter, R. (1992). The effect of hypothyroidism in Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology*, 131: 1574-1576.

Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323-330.

Wewer, U. M., Shaw, L. M., Albrechtsen, R. and Mercurio, A. M. (1997). The integrin alpha 6 beta 1 promotes the survival of metastatic human breast carcinoma cells in mice. *Am. J. Pathol.*, 151: 1191-1198.



Wijsman, J. H., Jonker, R. R., Keijzer, R., van de Velde, C. J., Cornelisse C. J. and van Die-rendonck, J. H. (1993). A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labelling of fragmented DNA. *J. Histochem. Cytochem.*, 41: 7-12.

Wolkowicz, M. J., Coonrod, S. M., Reddi, P. P., Millan, J. L., Hofmann, M. C. and Herr, J. C. (1996). Refinement of the differentiated phenotype of the spermatogenic cell line GC-2spd(ts). *Biol. Reprod.*, 55: 923-932.

Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. and Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249: 1431-1433.

Wu, L. C., Wang, Z. W., Tsan, J. T., Spillman M. A., Phung, A., Xu, X. L., Yang, M. C., Hwang, L. Y., Bowcock, A. M. and Baer R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat. Genet.*, 14: 430-440.

Xiao, G. H., Jin, F. and Yeung, R. S. (1995). Germ-line Tsc2 mutation in a dominantly inherited cancer model defines a novel family of rat intracisternal-A particle elements. *Oncogene*, 6: 81-87.

Zhang, X. D. and Hersey, P. (1999). Expression of catenins and p120cas in melanocytic nevi and cutaneous melanoma: deficient alpha-catenin expression is associated with melanoma progression. *Pathology*, 31: 239-246.

Zimmermann, S., Schöttler, P., Engel, W. and Adham, I. (1997). Mouse Leydig Insulin-like (Ley-I-L) gene: structure and expression during testis and ovary development. *Mol. Reprod. Dev.*, 47: 30-38.

Zörnig, M., Klett, C., Loav, H., Hameister, H. and Winking H. (1995). Establishment of permanent wild-mouse cell lines with readily identifiable marker chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 74: 37-40.

## VII. Anhang

### Primersequenzen

A-myb-For:	5'- CAG TGC GTC ACT TAG CGA AGT TGG-3'
A-myb-Rev:	5'- TTC AGT TAG CAG TTG AGT CCC TGG-3'
β-Actin-For:	5'- GCG GAC TGT TAC TGA GCT GCG T-3'
β-Actin-Rev:	5'- GAA GCA ATG CTG TCA CCT TCC C-3'
CAT-For:	5'- CTC ATC CGG AAT TCC GTA TG-3'
CAT-Rev:	5'-GTT GTC CAT ATT GCC CAC GT-3'
Desmin-For:	5'- GTA CCA GGT GTC GCG CAC GTC GGG-3'
Desmin-Rev:	5'- GCT CGG AAG GCA GCC AAG TTG TTC-3'
EAP-For:	5'- CGC ACC AGT GAG CAG GAC ACG-3'
EAP-Rev:	5'- GCC CGG GCT CAC TGC ACT GC-3'
FLAG 5 AD:	5'- CGC TAG ACG ATT TCG ATC TG-3
GAPDH-For:	5'- CAT CAC CAT CTT CCA GAG C-3'
GAPDH-Rev:	5'- ATG ACC TTG CCC ACA GCC TT-3'
GFP-IF1-For:	5'- CCG GAATTC CAT GGG AGC CGT GAC TGA CGA CGA AG-3'
GFP-IF1-Rev:	5'- CGC GGA TCC CTA TGG CTT AGG ATC TGA TTC CAT G-3'
GFP-NIF3L1-For:	5'- CGC GGA TCC ATG TTG TCA TCT TGC GTA CGC-3'
GFP-NIF3L1-Rev:	5'- CGC GGA TCC TTA TAC CAC CTG AAG AGG GTG-3'
InsI3-For:	5'- TAC TGA TGC TCC TGG CTC TGG-3'
InsI3-Rev:	5'- TTA GAC TGT TTG GGA CAC AGG-3'
LTA-For:	5'- GCA GCT AAT GGA CCT TCT AGG-3'
LTA-R1:	5'- CAG GAG TAG CCT CAT CAT CAC
LTA-R2:	5'- GCC TCA TCA TCA CTA GAT GGC-3'

Lysozym M-For: 5'- GTG TGT TTA GCT CAG CAC GAG AGC-3'

Lysozym M-Rev: 5'- GCT GAA GTC CTG TGA CTT AGA GGG-3'

pGBT9-NIF3L1-For: 5'- CGC GGA TCC ATG TTG TCA TCT TGC GTA CGC-3'

pGBT9-NIF3L1-Rev: 5'- CGC GGA TCC TTA TAC CAC CTG AAG AGG GTG-3'

pGEX5': 5'- GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'

Pgk2-For: 5'- AGG AGA TAC TGC TAC TTG CTG CGC C-3'

Pgk2-Rev: 5'- GAT GAT GAC AGA ATT AAG ACT TGC T-3'

Proakrosin-For: 5'- GGC CTG GCC CTG GAT GGT CAG-3'

Proakrosin-Rev: 5'- CCC TCC GTC ACT ACG TTG TAT TTC-3'

pVP-NIF3L1-For: 5'- CGG GGT ACC ATG TTG TCA TCT TGC GTA CGC-3'

pVP-NIF3L1-Rev: 5'- CTA GTC TAG ATT ATA CCA CCT GAA GAG GGT-3'

Transferrin-For: 5'- CTC ACC GTG GGT GCC CTG CTG G-3'

Transferrin-Rev: 5'- GTG GAA AGT GCA GGC TTC CAG G-3'

Y2H2: 5'- AAT ACC ACT ACA ATG GAT G-3'

Y2HAD3': 5'- GTT GAA GTG AAC TTG CGG GG-3'

5'-GAL AC: 5'- GGA TGA TGT ATA ATA ACT ATC TA-3'

5'-Match: 5'- CGA TGA TGA AGA TAC CCC A-3'

45-For: 5'- AGG AGA TAC TGC TAC TTG CTG CGC C-3'

45-Rev: 5'- GAT GAT GAC AGA ATT AAG ACT TGC T-3'

45-Rev1: 5'- GCC ACA ACT TTG ACT TGG GAC-3'

45L1-For: 5'-CCT TCA GAT CCA TGA AGG AAC GG-3'

45L1-Rev: 5'- CCT TCA GAT CCA TGA AGG AAC GG-3'

45L2-For: 5'- AGC CCG CAG CCC TCC GCA GGG-3'

45L2-Rev: 5'- GTC ATT CAA GGA CGA GAG AAG AGC C-3'

## Publikationen

Tascou, S., Nayernia, K., Samani, A., Schmidtke, J., Vogel, T., Engel, W. and Burfeind, P. (2000). Immortalization of murine male germ cells at a discrete stage of differentiation by a novel promoter-based selection strategy. *Biol. Reprod.*, 63: 1555-1561.

Tascou, S., Nayernia, K., Engel, W. and Burfeind, P. (2000). Refinement of the expression pattern of a mouse homologue of the porcine 135-kDa-  $\alpha$ -D-Mannosidase (MAN2B2) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272: 951-952.

Tascou, S., Uedelhoven, J., Dixkens, C., Nayernia, K., Engel, W. and Burfeind, P. (2000). Isolation and characterization of a novel human gene, NIF3L1, and its mouse ortholog, Nif3l1; Highly conserved from bacteria to mammals. *Cytogenet. Cell Genet.*, 90: 330-336.

Tascou, S., Nayernia, K., Uedelhoven, J., Böhm, D., Jalal, R., Ahmed, M., Engel, W. and Burfeind, P. (2001). Isolation and characterization of differentially expressed genes in invasive and non-invasive immortalized murine male germ cells in vitro. *Int. J. Oncol.*, 18: 567-574.

## **Dankesworte**

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Engel für seine intensive wissenschaftliche Betreuung, seine permanente Unterstützung und sein Vertrauen. Seine immerzu währende Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht verdienen meine tiefste Anerkennung und vollsten Respekt.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. P. Burfeind bedanken. Seine Hilfsbereitschaft, seine ununterbrochene Unterstützung und seine aufmunternden Worte, gerade in den schlechten Tagen, lassen mich nur feststellen, dass ich sehr froh bin einen so netten und kompetenten Betreuer gehabt zu haben.

Bei Tae-Won-Kang und Christian Müller möchte ich mich für ihre absolute Zuverlässigkeit und für eine exzellente Zusammenarbeit bedanken.

Ferner möchte ich mich sehr herzlich bei Dr. Nayernia für seine Unterstützung und Betreuung während der ersten Monate meiner Promotion bedanken.

Herrn Dr. R. Trappe danke ich für seine konstruktiven Anregungen und Unterstützungen in den letzten Monaten.

PD. Dr. S. Bohlander, Dr. Ch. Netzer, Leonie Rieger und Michael Kickstein möchte ich für ihre tatkräftige und hervorragende Unterstützung beim „Yeast-Two-Hybrid-Screening“ danken.

Bei Stefan Wolf und Ramona Sommer möchte ich mich für eine zuverlässige und vortreffliche Tierpflege bedanken.

Herrn Dr. I. Adham danke ich für seine guten Ratschläge und die nette Atmosphäre im Schreibzimmer.

Außerdem möchte ich mich noch bei Dagmara Boinska, Jens Konjetzko, Markus Schelper, Martin Kämper und Manal Achmed für viele viele Hilfestellungen bedanken.

Im Rahmen wissenschaftlicher Kooperationen möchte ich mich bei folgenden Personen für eine erfolgreiche und gute Zusammenarbeit bedanken:

Dr. S. Schweyer (Universitätsklinikum Göttingen, Abt. Pathologie)

Dr. F. Alves (Universitätsklinikum Göttingen, Abt. Hämatologie und Onkologie)

Prof. Dr. L. Füzési (Universitätsklinikum Göttingen, Abt. Gastroenteropathologie)

Dr. S. Schulz-Schaeffer (Universitätsklinikum Göttingen, Abt. Neuropathologie)

PD. Dr. A. Meinhardt (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Philipps-Universität-Marburg).

Allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik danke ich für ihre Unterstützungen und die freundliche Atmosphäre.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Engel, Dr. P. Burfeind und Dr. R. Trappe außerdem für die Durchsicht des Manuskriptes.

Bei meinen Eltern, Geschwistern und Anja Fredrich möchte ich mich für ihre Liebe und Zuneigung bedanken und dafür, dass sie immer für mich da waren, wenn ich sie brauchte.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Sèmi Tascou  
geboren am 3. 4. 1974 in Kassel  
als Sohn der Elsa und des Lotfi Tascou

### Ausbildungsdaten:

1980-1984 Besuch der Grundschule in Kassel  
1984-1990 Besuch der Realschule in Kassel  
1990-1993 Besuch des Oberstufengymnasiums in Kassel  
Juni 1993 Abitur

Okt. 1993 - Okt.1995 Grundstudium der Chemie an der Gesamthochschule Kassel  
Okt. 1995 - Okt.1997 Hauptstudium der Chemie an der Ruhr-Universität-Bochum  
Nov.1997 - Juni 1998 Experimentelle Arbeiten zur Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. R. Heumann, Molekulare Neurobiochemie, Ruhr-Universität Bochum.

Juni 1998 Abschluss des Studiums der Chemie mit dem Diplom  
Aug.1998 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. W. Engel, wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Humangenetik in Göttingen.